

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



EDUARDO BRITTO DOS SANTOS DIZ FILHO

“Avaliação de anti-inflamatórios não esteroides comerciais (AINES) sobre a atividade e função de PLA₂ secretória isolada do veneno de *Bothrops leucurus*.”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Eduardo Britto dos Santos Diz Filho
e aprovada pela Comissão Julgadora.
Marcos Hikari Toyama

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

Orientador(a): Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama.

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
SÍLVIA CELESTE SÁLVIO – CRB8/7039
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

D648a

Diz Filho, Eduardo Britto dos Santos, 1978-
Avaliação de anti-inflamatórios não esteroidais
comerciais (AINES) sobre a atividade e função de PLA2
secretória isolada do veneno de *Bothrops leucurus* /
Eduardo Britto dos Santos Diz Filho. – Campinas, SP:
[s.n.], 2011.

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

1. Fosfolipase A2. 2. *Bothrops leucurus*. 3.
Antiinflamatórios não esteróides. 4. Cinética de
enzimas. 5. Inflamação. I. Toyama, Marcos Hikari.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Evaluation of comercial non-steroidal anti-inflammantory drugs (NSAIDs) on the activity and function of secretory PLA2 isolated from the venom of *Bothrops leucurus*

Palavras-chave em Inglês:

Phospholipase A2
Bothrops leucurus
Non-steroidal anti-inflammatory agents
Enzyme kinetics
Inflammation

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Bioquímica

Banca examinadora:

Marcos Hikari Toyama [Orientador]

Wagner Vilegas

Vera Lucia Bonfim Tiburcio

Mirela Batista Coelho

Daniela Carla da Silva Damico

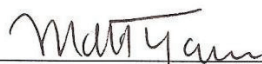
Data da defesa: 17-08-2011

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 17 de Agosto de 2011

BANCA EXAMINADORA

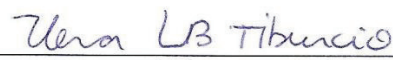
Prof(a). Dr. Marcos Hikari Toyama


Assinatura

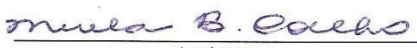
Prof(a). Dr. Wagner Vilegas


Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Vera Lucia Bonfim Tiburcio


Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Mirela Batista Coelho


Assinatura

Prof(a). Dr(a) Daniela Carla da Silva Damico


Assinatura

Prof(a). Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

Assinatura

Prof(a). Dr. José Camillo Novello

Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Daniela Gois Beghini

Assinatura

INDICE

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 1 | AGRADECIMENTOS | 1 |
| 2 | RESUMO | 2 |
| 3 | ABSTRACT | 3 |
| 4 | INTRODUÇÃO | 5 |
| 4.1 | CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ACIDENTES BOTRÓPICO. | 5 |
| 4.2 | ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS FOSFOLIPASES A2 | 6 |
| 4.3 | ASPECTOS GERAIS DA INFLAMAÇÃO | 8 |
| 4.4 | PLA₂ E O PROCESSO INFLAMATÓRIO. | 10 |
| 4.4.1 | PLA ₂ E MEMBRANA CELULAR. | 10 |
| 4.4.2 | PLA ₂ SECRETÓRIAS E INFLAMAÇÃO. | 14 |
| 4.5 | ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES (AINES). | 16 |
| 4.5.1 | PRINCIPAIS EFEITOS E APLICAÇÕES CLÍNICAS. | 17 |
| 4.5.2 | CLASSIFICAÇÃO DOS AINES | 18 |
| 4.6 | CICLOOXIGENASES (COX) | 21 |
| 4.6.1 | AÇÃO DOS AINES SOBRE AS FOSFOLIPASES A2 SECRETÓRIAS | 22 |
| 4.7 | FUNDAMENTOS TEÓRICOS. | 23 |
| 5 | OBJETIVOS | 28 |
| 6 | MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 6.1 | ANIMAIS | 28 |
| 6.2 | VENENOS E REAGENTES | 29 |
| 6.3 | PURIFICAÇÃO DA PLA₂ | 30 |
| 6.3.1 | CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR | 30 |
| 6.3.2 | CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM HPLC. | 31 |
| 6.3.3 | CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA EM HPLC | 31 |
| 6.3.4 | ANÁLISE DO GRAU DE PURIFICAÇÃO DA TOXINA: | 32 |
| 6.4 | PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA TESTE | 32 |
| 6.5 | ELETROFORESE EM PAGE-SDS | 33 |
| 6.6 | DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A2 | 33 |
| 6.7 | CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA PLA₂. | 34 |
| 6.8 | ATIVIDADE MIOTÓXICA | 34 |
| 6.9 | EDEMA DE PATA | 35 |
| 6.10 | EDEMA DE PELE | 35 |
| 6.11 | ATIVIDADE DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA | 36 |
| 6.12 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 37 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 7 | RESULTADOS | 38 |
| 7.1 | PURIFICAÇÃO DA PLA₂ | 38 |
| 7.1.1 | ANÁLISE DO VENENO TOTAL EM HPLC DE EXCLUSÃO MOLECULAR. | 38 |
| 7.1.2 | ANÁLISE DO VENENO TOTAL EM HPLC DE TROCA IÔNICA. | 38 |
| 7.1.3 | ANÁLISE DO VENENO TOTAL EM HPLC DE FASE REVERSA. | 39 |
| 7.1.4 | ATIVIDADE ESPECÍFICA PARA PLA ₂ | 40 |
| 7.1.5 | CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA | 42 |
| 7.2 | CÁLCULO DE DOSAGEM DE MEDICAMENTO | 43 |
| 7.3 | ANÁLISE DE PLA₂ POR ESPECTRO UV-VISÍVEL EM HPLC | 44 |
| 7.4 | ELETROFORESE EM SDS-PAGE | 45 |
| 7.5 | CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA PLA₂. | 45 |
| 7.6 | ATIVIDADE MIOTÓXICA | 50 |
| 7.7 | EDEMA DE PATA | 54 |
| 7.8 | ATIVIDADE HEMORRÁGICA | 58 |
| 7.9 | EDEMA DE PELE | 60 |
| 7.10 | ATIVIDADE DE AGREGAÇÃO DE PLAQUETAS | 64 |
| 8 | DISCUSSÃO | 65 |
| 9 | CONCLUSÃO | 69 |
| 10 | BIBLIOGRAFIA | 70 |
| 11 | ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES | 77 |
| 12 | ABREVIACÕES | 78 |
| 13 | ANEXOS | 79 |
| 13.1 | APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA | 79 |
| 13.2 | DECLARAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA | 80 |
| 13.3 | TRABALHOS PUBLICADOS NO PERÍODO | 81 |

1 AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e seu infinito amor.

Ao Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama – Campus Experimental Litoral Paulista – UNESP, pela orientação.

Ao Professor Sergio Marangoni, pela oportunidade e confiança.

Ao Paulo Baldasso pelo apoio técnico, competência e amizade.

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

Aos docentes, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia UNICAMP que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho, pelo carinho, amizade e pela convivência durante esse período.

Aos amigos do Laquip, especialmente Simone, Camila e Veronica, pela ajuda, sugestões e amizade, sempre me deram força e principalmente estavam presentes para conversar fiado.

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

A Renata, minha noiva, que sempre me incentivou a concluir este trabalho.

A Capes pelo apoio financeiro.

Muito Obrigado

2 RESUMO

Os Anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) constituem uma classe de medicamentos com prescrição mundial, pois são fármacos que auxiliam na terapia de vários processos patológicos visto que oferecem ações farmacológicas: anti-inflamatória, analgésica e antipirética, como efeitos primários. A venda dos AINES no Brasil é de forma “livre”, porém, nos EUA é realizada somente sob prescrição médica. Apesar do grande número de informações acumuladas durante anos de pesquisa a respeito destas drogas sobre as atividades das Ciclooxygenases 1 e 2 (COX 1 e COX 2), respectivamente, do seu papel como ferramenta molecular para o estudo das vias biossintéticas das prostaglandinas e dos avanços em relação a sua síntese e síntese de novos AINES, não se tem conhecimento da atuação dessas drogas sobre a estrutura e função das Fosfolipases A2 secretórias (PLA₂s), responsáveis pela produção do ácido araquidônico precursor de vários tipos de derivados lipídicos biologicamente ativos e responsável pelo processo inflamatório.

O Objetivo deste trabalho é responder questões relacionadas à ação dos AINES sobre a ação de PLA₂ de serpentes, responsáveis por eventos farmacológicos principalmente relacionados com edema. Esta atividade inflamatória pode ser desencadeada tanto por PLA₂ enzimaticamente ativas, como não ativas, ambas induzindo o efeito de inflamação aguda por mecanismos ainda controversos.

O trabalho utilizou PLA₂ farmacologicamente ativa (destacadamente no processo inflamatório), isoladas do veneno de serpentes *Bothrops leucurus*, em ensaios de cinética enzimática, atividade farmacológica relacionados ao edema, agregação plaquetária, mionecrose e neurotoxicidade conduzidos em presença das toxinas puras, das toxinas em presença dos AINES, em ensaios com prévio tratamento dos AINES e posterior aplicação das PLA₂. Para uma avaliação mais precisa das alterações induzidas por estes AINES

(princípios ativos puros ou drogas comerciais) foram empregadas técnicas de varredura em espectrofotômetro de UV-Vis (220-700nm) para averiguar possíveis modificações do espectro de absorbância da PLA₂ e do AINES após a incubação o que poderia indicar modificações estruturais na PLA₂, induzidas por estas drogas. Além de avaliar a ação específica dos AINES sobre as PLA₂, secundariamente, o trabalho possibilitou conhecer alguns aspectos físico-químicos e estruturais de PLA₂ isoladas do veneno de *Bothrops leucurus*. Os resultados determinaram que, embora não ocorram interações estruturais entre os AINES e as PLA₂, foram evidenciadas alterações de atividade farmacológica.

Palavras chaves: Fosfolipase A2 secretória Classe II, *Bothrops leucurus*, Drogas anti-inflamatórias não esteróides (AINES), cinética enzimática e inflamação.

3 ABSTRACT

Anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are a class of prescription drugs worldwide, as are drugs that help in the therapy of various pathological processes as they offer pharmacological actions: anti-inflammatory, analgesic and antipyretic, such as primary effects. The sale of NSAIDs in Brazil are "free", but the U.S. is performed only by prescription. Despite the large amount of information accumulated through years of research on these drugs on the activities of the cyclooxygenases 1 and 2 (COX 1 and COX 2), respectively, of their role as a molecular tool for studying the biosynthetic pathways of prostaglandins and advances in respect of its synthesis and synthesis of new NSAIDs, there are no known performance of these drugs on the structure and function of secretory phospholipase A2 (PLA₂s), responsible for the production of arachidonic acid precursor of various biologically active lipid derivatives and responsible for the inflammatory process.

This paper aims to answer questions related to the action of NSAIDs on the action of PLA₂ of snakes responsible for pharmacological events mainly related to edema. This inflammatory activity can be triggered by PLA₂ enzymatically active and non active, inducing both the effect of acute inflammation by still controversial.

The paper uses PLA₂ pharmacologically active (highlighted in the inflammatory process), isolated from *Bothrops leucurus* snake venom and *Bothrops jararacussu* in enzyme kinetics assays, pharmacological activity related to edema, platelet aggregation, and neurotoxicity myonecrosis conducted in the presence of pure toxins, the toxins in the presence of NSAIDs, previous treatment trials with NSAIDs and the subsequent application of PLA₂. For a more accurate assessment of changes induced by these NSAIDs (pure active ingredients or drugs trade) is employed techniques of scanning UV-Vis spectrophotometer (220-700nm) to ascertain possible modification of the absorbance spectrum of PLA₂ and NSAIDs after incubation which could indicate structural changes in PLA₂, induced by these drugs. In addition to assessing the specific action of NSAIDs on PLA₂ secondarily work enables to know some physical-chemical aspects and structures of PLA₂ isolated from the venom of *Bothrops leucurus*. The results determine that although there occur structural interactions between NSAIDs and PLA₂ activity were observed pharmacological changes

Keywords: secretory phospholipase A2 Class II, *Bothrops leucurus*, anti-inflammatory drugs (NSAIDs), enzyme kinetics and inflammation.

4 INTRODUÇÃO

4.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ACIDENTES BOTRÓPICO.

No Brasil, no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993, foram notificados à Fundação Nacional de Saúde – Ministério da Saúde (FUNASA 2001) 81.611 casos de acidentes por serpentes, o que representa aproximadamente 20.000 casos/ ano no país. Em números absolutos, o acidente com veneno Botrópico é o que apresenta maior número: são 59.619 notificações.

Os venenos das serpentes Botrópicas causam, quando injetados na vítima, intensa dor local, às vezes com hemorragia e necrose teciduais tão graves que requerem a amputação do membro atingido (Brazil, 1911; Jiménez - Porras, 1973). Os venenos destas serpentes também são responsáveis por diversos outros efeitos tais como: coagulação sanguínea, parada cardiovascular, hemorragias, mioglobinúria e liberação de compostos farmacologicamente ativos, semelhantes à histamina e bradicinina (Rothchild; Rothchild, 1979). Isto devido às suas ações coagulante, proteolítica e hemorrágica.

Ação Coagulante: O veneno das serpentes botrópicas tem a propriedade de transformar diretamente o fibrinogênio em fibrina, além de ativar a protrombina da cascata de coagulação sanguínea. A fração do veneno que possui esta ação coagulante atua de maneira diferente da trombina fisiológica, pois não é neutralizada pela heparina (Queiroz, et al., 1984).

Ação Proteolítica ou Necrosante: Decorre da ação citotóxica direta nos tecidos por frações proteolíticas do veneno. Essa ação está relacionada com a quantidade de veneno

inoculado, podendo haver liponecrose, mionecrose e lise das paredes vasculares (Queiroz, et al., 1984).

Ação hemorrágica: Esta ação, quando sistêmica, é causada por fatores hemorrágicos denominados hemorraginas. Estas agem sobre vasos capilares, destruindo inicialmente a membrana basal e causando sua posterior ruptura. A ação das hemorraginas explica casos de hemorragias sistêmicas, às vezes fatais, que ocorrem no cérebro, afetando o funcionamento do sistema nervoso central. (Queiroz, et al., 1984)

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

4.2 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).

A unidade catalítica das fosfolipases A₂ (PLA₂) (Figura 3.1) é constituída principalmente pelo resíduo de His-48, onde se pode observar a ligação de uma molécula de água. No mecanismo de catálise proposto, (Verheij et al., 1980) (Figura 3.2) um próton na posição 3 do anel imidazólico do aminoácido His-48 foi envolvido em uma forte interação com o grupo carboxílico da Asp-99, impedindo que ocorra uma rotação no anel

imidazol (que foi envolvido com a catálise), deixando o nitrogênio da posição 1 deste anel na posição espacial própria.

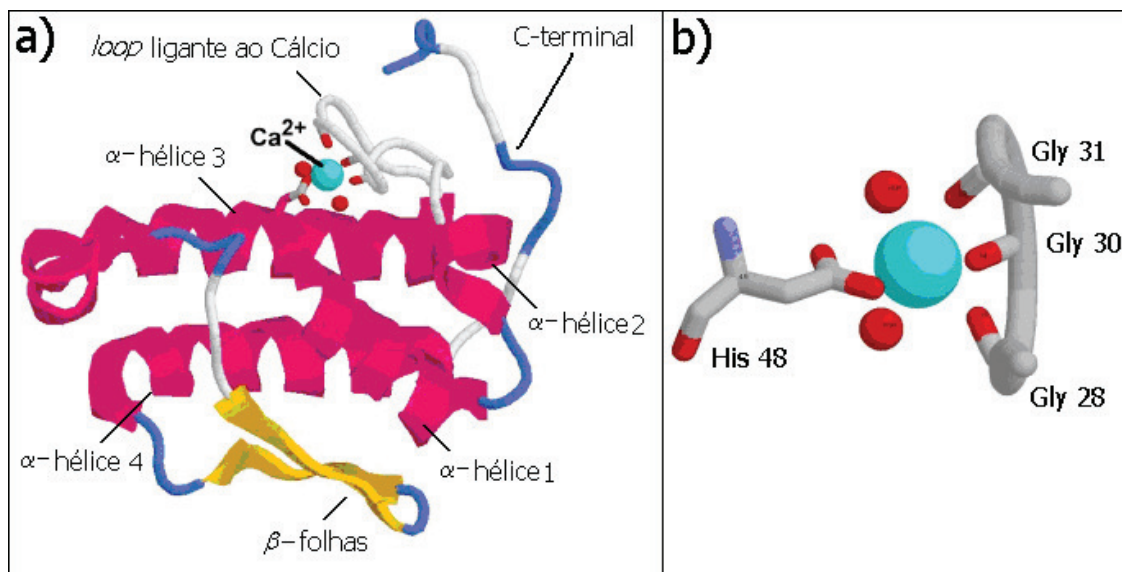


Figura 3.1. a) Estrutura terciária da PLA₂ de Bothrops pirajai, destacando-se a localização das estruturas secundárias desta molécula. B) Detalhes do sítio de ligação do cálcio e sua coordenação com o loop de ligação do cálcio e com a His 48 (Rigden et al., 2003).

Uma molécula de água promoveu, então, um ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do substrato e, nesse momento, o anel imidazol da His-48 recebeu um próton da molécula de água facilitando a reação. Logo após ocorreu a hidrólise da união acil-éster na posição sn-2 do fosfoglicerídeo (substrato), este próton foi doado pelo anel imidazol para o oxigênio que formou, então, um grupo álcool de lisofosfolípídeo a ser liberado (Verheij, et al., 1980).

O sítio para ligação do cálcio, importante para a catálise, apresentou um cálcio ligado pelo oxigênio do grupo carbônico dos resíduos Gly-28, Gly-30, Gly-31 e por oxigênio da cadeia lateral do resíduo Asp-49. No mecanismo de catálise, o cálcio tem dupla função, a primeira é fixar o fosfato, e a segunda é estabilizar a carga negativa do oxigênio do grupo carbônico da ligação éster na posição sn-2 do substrato (Yang, 1994).

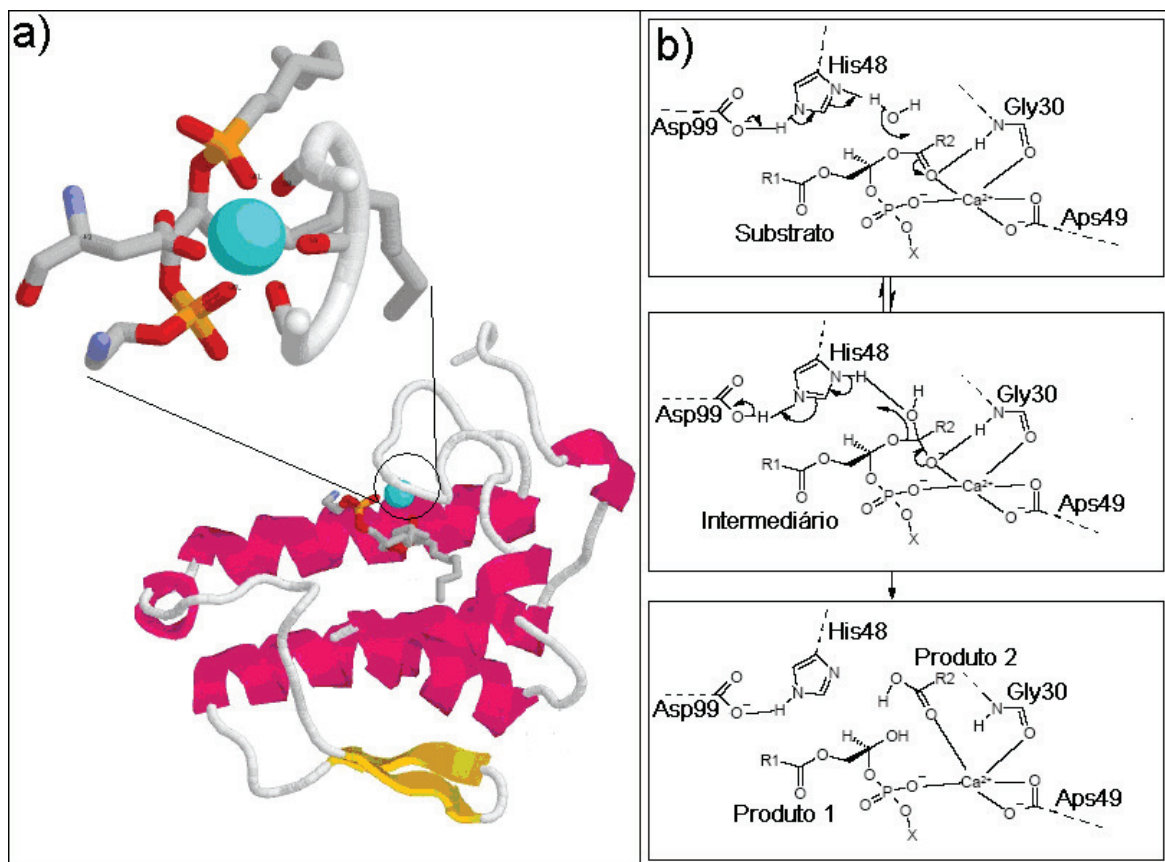


Figura 3.2. Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para a PLA₂. (Verheij et al, 1980). a) Estrutura terciária da PLA₂, destacando-se o *loop* ligante ao Cálcio. b) Estágios do mecanismo de catálise: ataque base mediado sobre o substrato, formação e colapso do intermediário tetraédrico, liberação dos produtos.

4.3 ASPECTOS GERAIS DA INFLAMAÇÃO

A inflamação pode ser definida como uma reação da microcirculação induzida por uma injúria aos tecidos, com a consequente movimentação de elementos intravasculares, como fluídos, células e moléculas, para o espaço extravascular. Ela é caracterizada por alterações no calibre vascular, com consequente aumento do fluxo sanguíneo, alterações estruturais nos componentes de microcirculação, acarretando em aumento da permeabilidade vascular e na saída de células e moléculas dos vasos para os tecidos; migração de células de defesa (leucócitos) e acúmulo no espaço extravascular, onde ocorreu a injúria. A agressão tecidual é o agente desencadeador da resposta inflamatória,

por induzir o rompimento da homeostasia mantida através da relação célula-meio, este último representado pelos fluídos extracelulares e a microcirculação (Siqueira Jr., 2000). A agressão tecidual pode ser de origem biológica (microrganismo), física (mecânica, térmica e radiação) ou química. Ao nível macroscópico, a resposta inflamatória geralmente é acompanhada de sinais clínicos bem conhecidos com eritema, calor, edema, dor e perda da função (Siqueira Jr., 2000).

Durante a inflamação há a produção de mediadores inflamatórios. Estes compostos são derivados do hospedeiro que são secretados por células ativadas e servem para ativar ou aumentar aspectos específicos da inflamação. Segundo Siqueira Jr (2000) estes compostos são ditos pró-inflamatórios e por sua vez, são classificados em 4 grupos, a seguir:

A. Mediadores vasoativos e constritores do músculo liso:

- i. Histamina e serotonina;
- ii. Metabólitos do ácido araquidônico (AA);
- iii. Fator de agregação plaquetária (PAF);
- iv. Adenosina
- v. Óxido nítrico;
- vi. Outros mediadores: neuropeptídeos.

B. Mediadores quimiotáticos:

- i. Citocininas: IL-1, IL-2, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{TNF}\beta$;
- ii. Componentes do complemento: especificamente C5A;
- iii. PAF (direcionada a neutrófilos e eosinófilos);
- iv. Produtos da via lipoxigenase, basicamente LTB-4.

C. Mediadores enzimáticos:

- i. Sistema complemento: C3, C5A, C3B, C3BI, C5B-9.
- ii. Sistema cinina: Bradicinina;
- iii. Sistema de coagulação: trombina e fator Xa.

D. Proteoglicanas

- i. Radicais livres derivados do oxigênio
- ii. Fatores de crescimento.

As respostas inflamatórias ocorrem em três fases diferentes, cada qual aparentemente mediada por mecanismos diversos: (a) fase transitória ou aguda é uma resposta imediata, que tem curta duração, sejam minutos, horas ou não excedendo a dois ou três dias. É caracterizada por vasodilatação localizada e aumento da permeabilidade microvascular; (b) fase subaguda ou tardia, marcada principalmente pela presença de neutrófilos e células fagocitárias; e (c) fase proliferativa ou crônica, na qual há degradação tecidual e fibrose, durando muitos dias, meses ou até mesmo anos em algumas doenças não tratadas (Siqueira Jr., 2000).

4.4 PLA₂ E O PROCESSO INFLAMATÓRIO.

4.4.1 PLA₂ E MEMBRANA CELULAR.

As PLAs₂ são enzimas importantes para a atividade celular, pois hidrolisam fosfolípidios de membrana e constitui a via predominante para a produção de ácido araquidônico, precursor de mensageiros químicos que incluem as prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos. Ainda, após hidrolizarem 1-o-alkil, 2-araquidonilglicerofosfolina, algumas enzimas geram o liso-PAF, precursor do fator ativador de plaquetas (PAF). Os derivados do ácido araquidônico e o PAF, além de

mediadores de fenômenos fisiológicos, estão envolvidos em vários processos inflamatórios (Oka e Arita, 1991, Granger e Kubes, 1994 e Murakami et al., 1997).

Estas PLA₂s constituem as PLA₂s citossólicas que atuam sobre a bicamada de fosfolípidios (também conhecida como glicerofosfolídeos) que compõem a membrana plasmática principalmente de células excitáveis. Os glicerofosfolídeos (fosfotidiletanolamina-PE, fosfatidilcolina-PC e fosfatidilserina-PS e outros), juntamente com o colesterol, são os principais componentes da bicamada da membrana neural e formam a matriz na qual receptores, canais iônicos e outras proteínas envolvidas em tradução de sinais estão alojados (Agranoff et al., 1999). Esses compostos contêm uma unidade de glicerol como componente básico, ao qual um grupo fosfato (PO₄) é esterificado no carbono α (*sn*-3) e dois ácidos graxos esterificados nos dois átomos de carbono remanescentes (posição *sn*-1 e *sn*-2). O glicerol e o PO₄ que é ligado a uma base (etanolamina, colina, serina, inositol) ou a um átomo de hidrogênio (ácido fosfático), formam a cabeça polar (hidrofílica), e os ácidos graxos esterificados formam a cauda apolar (hidrofóbica) dos glicerofosfolídeos (Figura 3.3).

Os ácidos graxos podem ter de 16 a 24 átomos de carbono e, normalmente, a primeira cadeia é saturada (*sn*-1) e a segunda insaturada (*sn*-2) com uma ou mais duplas ligações. O grau de insaturação dessas moléculas determina o arranjo espacial bem como a fluidez da membrana e também podem modificar o funcionamento das células como no caso das células que influenciam e alteram o micro-ambiente e, conseqüentemente, a estrutura e função de receptores, canais iônicos e enzimas. Os ácidos graxos essenciais presentes nas membranas contribuem para a regulação celular por atuarem como uma fonte de

precursores para segundo mensageiros na transdução de sinal intra- e inter celulares (Agranoff et al., 1999 e Fenton et al., 2000).

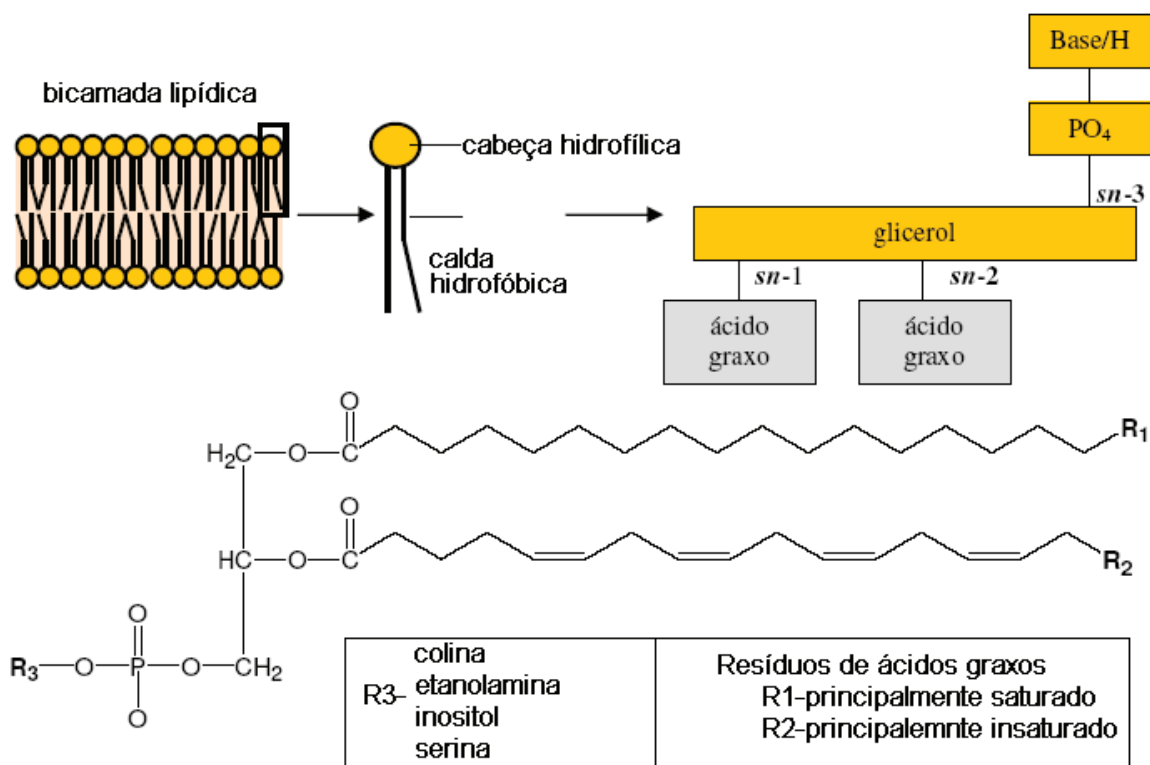


Figura 3.3. Estrutura química dos glicerofosfolípidios de membranas celulares. Na posição sn-1 é geralmente encontrado um resíduo de ácido graxo saturado, como ácido palmítico ou esteáricos, e na posição sn-2 um resíduo de ácido graxo insaturado, como ácido oléico, linolênico ou araquidônico. O grupo fosfato é ligado a um átomo de hidrogênio – H (ácido fosfatídico) ou a uma base, como a colina ou etanolamina.

O controle do metabolismo de fosfolípidios torna-se crucial para o desempenho das atividades celulares e este metabolismo é controlado por enzimas ligadas à membrana, sendo mais relevante à PLA₂. A PLA₂ citossólica, então catalisa a clivagem da ligação éster da posição sn-2 dos fosfolípidios (principalmente, PC), liberando ácidos graxos essenciais (AGE), como o ácido araquidônico, que por sua vez pode atuar como um segundo mensageiro, sendo também precursor, através da ação de lipooxigenases e ciclooxigenases, de eicosanóides (importantes na estimulação do processo inflamatório em si, que vão desde asma até artrite; e nas transduções de sinal, que podem desencadear efeitos farmacológicos

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

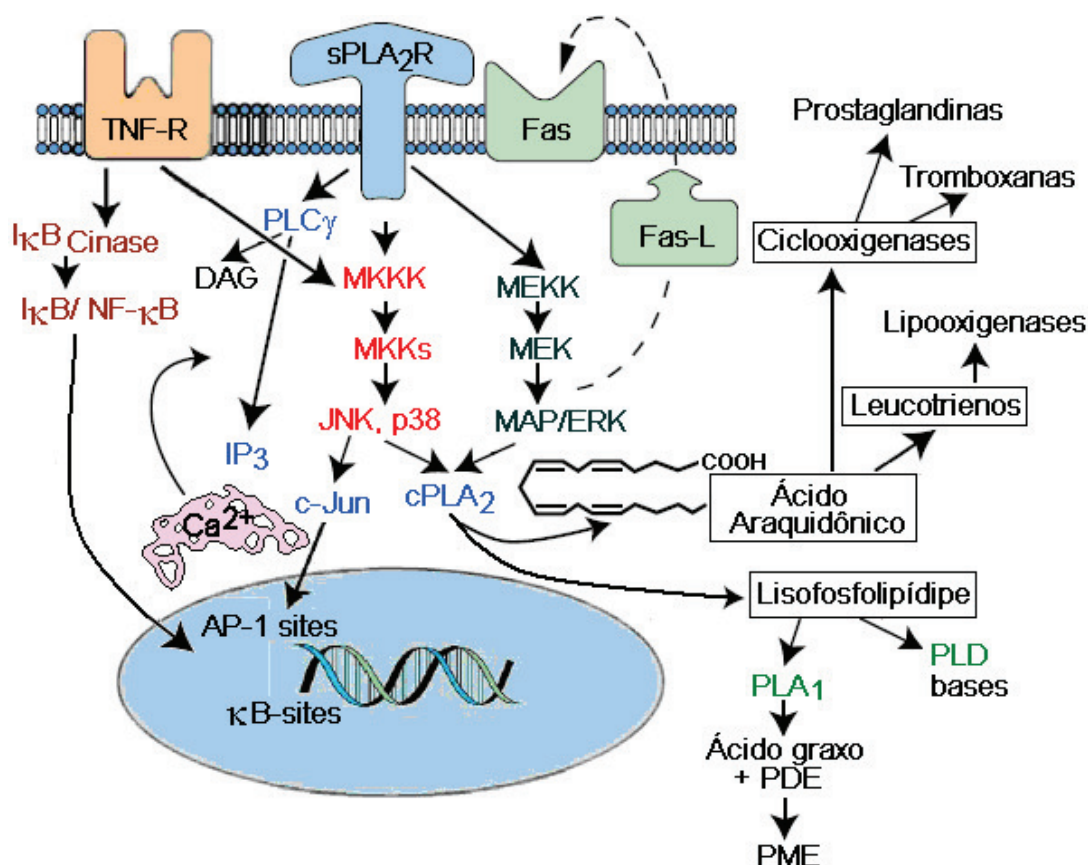


Figura 3.4. Esquema mostrando o mecanismo de ação pró-inflamatório das PLA₂ baseado nos trabalhos descritos por Valentin et al., (1999), Six e Denni, (2000), Murakami e Kudo, 2002 e Fuentes et al., (2002).

Outros produtos da clivagem dos fosfolípidios de membrana pela PLA₂ são os lisofosfolípidos, importantes na sinalização celular, remodelamento de fosfolípidos e propriedade da fluidez e permeabilidade da membrana (Dennis, 1994, Six e Dennis, 2000, Horrocks e Farooqui, 2004, Schaloske e Dennis, 2006) (Figura 3.4). Os lisofosfolípidos sofrem a ação subsequente da fosfolipase A2 (PLA₂) para liberar o ácido graxo da posição sn-2. O outro produto da ação da PLA₂ consiste de fosfodiésteres (PDE), que por sua vez

são clivados pela fosfodiesterases, produzindo fosfomonoésteres (PME), que são usados na síntese de novos fosfolípidios de membrana (Horrocks e Farooqui, 2004 e Schaloske e Dennis, 2006).

4.4.2 PLA₂ SECRETÓRIAS E INFLAMAÇÃO.

A participação das PLA₂ do grupo II em processos em que há o desenvolvimento de reação inflamatória, como artrite e asma, está bem estabelecida. Vários dados sobre a atividade inflamatória destas enzimas estão baseados em estudos experimentais utilizando PLA₂s purificadas de pâncreas e de venenos ofídicos (Nevalainen et al., 2000). A capacidade das PLA₂s secretórias causarem edema foi primeiramente demonstrada quando se observou que PLA₂ ofídicas provocam edema de pata de rato (Brain et al., 1977) e degranulação de mastócitos *in vitro* (Damerou et al., 1975). Estudos posteriores propuseram que o edema induzido por estas PLA₂ não dependia somente da ação da histamina e serotonina, mas também de prostaglandinas e cininas. A ação conjunta de todos esses autacóides na microcirculação local seria a causa da formação de edema (Bonta et al., 1979).

Em 1989, Cirino e colaboradores., estudaram o edema de pata de rato causado por PLA₂ purificadas dos venenos de *Naja mocambique mocambique*, *Vipera russeli*, *Apis mellifera* e PLA₂ pancreática porcina. As PLA₂ isoladas dos venenos foram mais potentes do que a pancreática porcina o que poderia refletir as propriedades líticas dessas enzimas, ou seja, a PLA₂ pancreática porcina apresenta baixa atividade catalítica, e por isso, pequena atividade edematogênica. Foi também observado que o tratamento dessas enzimas com o brometo de ρ -bromofenacil (inibidor do sítio ativo de PLA₂) inibiu somente o edema induzido pela PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*. No edema induzido por

esta PLA₂, em particular, os autores testaram algumas drogas dentre as quais somente a metisergida e a dexametasona foram capazes de inibir significativamente o edema. Assim, concluíram que neste caso, o edema é dependente da ação da serotonina proveniente da degranulação de mastócitos à semelhança de outras PLA₂. Estes resultados estão também de acordo com aqueles obtidos por Moreno et al., (1992) que demonstraram que o edema de pele em ratos induzidos pela PLA₂ do veneno de *Naja naja* em ratos é dependente dos mediadores liberados pelos mastócitos o qual é, por sua vez, dependente da atividade desta enzima.

Wang e Teng (1990) conduziram um estudo comparativo de edema de pata e degranulação de mastócitos peritoneais de ratos induzidos por duas PLA₂: PLA₂ do veneno de *Naja naja atra* (PLA₂ ácida) e PLA₂ do veneno de *Trimeresurus mucrosquamatus* (PLA₂ básica). De modo geral, as PLA₂ básicas são farmacologicamente mais potentes do que as ácidas (Ferreira T et al. 2009). Acredita-se que isso seja devido às propriedades catiônicas desta enzima uma vez que PLA₂ básicas apresentam maior número de sítios positivos do que as PLA₂ ácidas. De fato, a PLA₂ de *T. mucrosquamatus*, apesar de menos ativa enzimaticamente, foi mais potente do que a PLA₂ de *Naja naja atra* na indução do edema. Estes autores demonstraram que a heparina (um poliânion que previne a degranulação de mastócitos por policações) foi capaz de suprir somente o edema induzido pela PLA₂ básica. Com relação ao brometo de p-bromofenacil, substância capaz de bloquear a atividade das PLA₂ observou-se que o mesmo inibiu os efeitos de ambas PLA₂. A combinação de heparina e tratamento com brometo de p-bromofenacil preveniram totalmente o edema induzido pela PLA₂ básica de *T. mucrosquamatus*. Estes autores sugerem que as diferentes PLA₂s podem induzir efeitos pró-inflamatórios por, pelo menos,

três diferentes mecanismos: I) atividade enzimática, II) quantidade de sítios positivos na molécula e III) presença de um sítio farmacológico com participação de resíduos positivos.

4.5 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES (AINES).

O mecanismo de ação dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), ocorre através da inibição de um sistema enzimático denominado ciclooxigenase (COX); o qual é responsável pela síntese de diferentes tipos de prostaglandinas e estas enzimas podem ser divididas em dois tipos COX 1 e COX 2. As COX(s) transformam ácido araquidônico, proveniente da ação catalítica de PLA₂ citoPLAsmáticas sobre lipídeos de membrana, em mediadores prostanóides. Há dois tipos, a COX 1, presente em quase todos os tecidos; e a COX 2, induzida localmente por ocitocinas produzidas por leucócitos em resposta a danos ou invasão microbiana. A COX 1 é essencialmente, mas não exclusivamente, pró-inflamatória, uma vez que fisiologicamente existem tecidos que a produzem em baixas concentrações, como o renal, pulmonar e cerebral. A COX 2 tem papel importante na geração da inflamação, uma vez que ela produz os mediadores pró-inflamatórios, como algumas prostaglandinas e leucotrienos.

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são um grupo de fármacos com funções de inibição da inflamação e anestesia locais. A este grupo pertencem alguns dos fármacos mais conhecidos, como o Ácido acetil salicílico e Paracetamol, que são largamente difundidos na população em geral. Os AINEs são inibidores específicos da enzima ciclooxigenase (COX) e também possuem um efeito antipirético pela inibição da síntese de prostaglandina E₂. Esta prostaglandina é um mediador importante para a ativação do centro nervoso (no hipotálamo) e regulador da temperatura corporal. Altos níveis de

prostaglandina E2 em estados inflamatórios (como infecções) elevam a temperatura (Wynne e Campbell, 1994; Rang et al., 2001; Shah N.G. et al. 2010)

4.5.1 PRINCIPAIS EFEITOS E APLICAÇÕES CLÍNICAS.

Estas drogas são empregadas de forma rotineira em várias aplicações terapêuticas, que visem ao tratamento de alguma disfunção de ordem inflamatória.

A. Efeitos analgésicos que são decorrentes da inibição da produção local de prostaglandinas durante a inflamação. Estas prostaglandinas se forem produzidas, vão sensibilizar as terminações nervosas locais da dor, que será iniciada por outros mediadores inflamatórios como a bradicinina. Analgesia, principalmente de causa inflamatória, sendo que nesta aplicação estão sintomas relacionados às dores de cabeça, dores musculares e em procedimentos pós-cirúrgicos.

B. Os efeitos anti-inflamatórios também estão largamente dependentes da inibição da produção de prostanóides, já que estes mediadores são importantes em quase todos os fenômenos associados à inflamação, como vasodilatação, dor e atração de mais leucócitos ao local. Exemplo: Ação anti-inflamatória, como para artrite reumatóide, crise de gota e qualquer outra condição inflamatória dolorosa.

C. O efeito antipirético é decorrente da inibição de prostaglandina E2 pela COX 1. Exemplo: Febre, onde estas drogas são usadas para atenuar o quadro febril de pacientes, com crises febris com temperaturas acima de 40° C.

Assim, os AINEs tem clinicamente três efeitos benéficos principais: diminuem a resposta inflamatória, reduzem a dor de fundo inflamatório e diminuem a febre. Contudo, entre os efeitos adversos estão relacionadas principalmente a diminuição ou inibição da atividade da COX 1 e secundariamente da COX 2, que podem levar a uma diminuição da síntese de prostaglandinas e de outros mediadores pró-inflamatórios.

4.5.2 CLASSIFICAÇÃO DOS AINES

A classificação dos AINEs é feita baseada em sua estrutura química, grupo funcional principal, características similares estruturais e tolerância, desta forma podemos ter as seguintes classes de AINEs (Frolich, 1997).

A. Derivados do ácido salicílico, que incluem drogas como o ácido acetil salicílico (AAS).

B. Derivados da pirazolona, que incluem a dipirona sódica (novalgina)

C. Derivados do para-aminofenol, que incluem medicamentos como o paracetamol.

D. Derivados do ácido fenilacético, cujo princípio ativo é encontrados no diclofenaco de sódio (voltaren).

E. Derivados do ácido indolacético, que incluem drogas derivadas da indometacina como o indocid.

F. Derivados do ácido propiônico, onde estão derivados do naproxeno (naproxyn) e ibuprofeno (motrin).

G. Derivados do ácido fenilntranílico, que são a base de drogas antiinflamatórias e analgésicas como o ácido mefenâmico (ponstan).

H. Derivados dos ácidos enólicos são a base de drogas que são corriqueiramente usadas em uma única dose diária como o piroxicam (Feldene).

A tabela 3.1 lista alguns dos anti-inflamatórios não esteroides, e a tabela 3.2 lista os anti-inflamatórios não esteroides utilizados no trabalho, com suas estruturas químicas.

| Nome | Nomes comerciais comuns |
|--------------------------------------|---|
| Salicilatos | |
| Ácido Acetilsalicílico | Aspirina, Ascriptin, Bufferin, Excedrin |
| Diffunisal | Dolobid |
| Salsalato | Salflex, Disalcid |
| Salicilato de Magnésio | Doan's Analgesic |
| Pirazolônicos | |
| Dipirona | Dorflex |
| Fenilbutazona | Azolid, Butazolidin |
| Oxifenilbutazona | |
| p-Aminofenólicos | |
| Paracetamol | |
| Derivados do ácido acético | |
| Aceclofenaco | |
| Cetorolaco | Toradol |
| Diclofenaco | |
| Diclofenaco de sódio | Voltaren |
| Etodolaco | Lodine |
| Glucametacina | |
| Indometacina | Indocin |
| Sulindac | Clinoril |
| Derivados do ácido proptônico | |
| Cetoprofeno | Orudis |
| Flurbiprofeno | Ansaid |
| Ibuprofeno | Advil, Motrin |
| Loxoprofeno | |
| Naproxeno | Aleve, Naprosyn |
| Naproxeno de sódio | Anaprox |
| Oxaprosin | Daypro |
| Carprofeno | Rimadyl |
| Fenoprofeno | Nalfon |
| Derivados do ácido enólico | |
| Meloxicam | |
| Piroxicam | Feldene |
| Tenoxicam | |
| Sulfonanilidas | |
| Nimesulida | |
| Seletivos | |
| Celecoxibe | Celebrex |
| Etoricoxibe | |
| Lumiracoxibe | Prexige |
| Parecoxibes | |
| Rofecoxibe | Vioxx |

Tabela 3.1 alguns dos anti-inflamatórios não esteroides

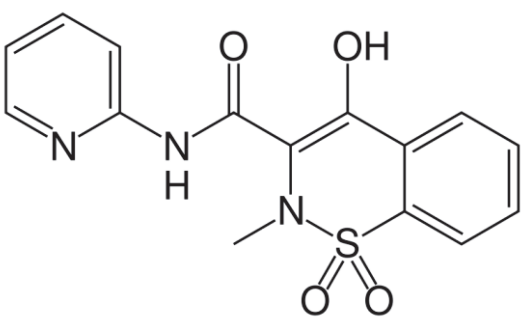
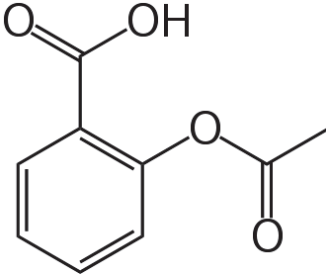
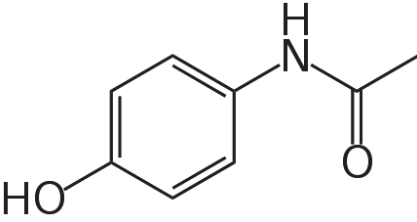
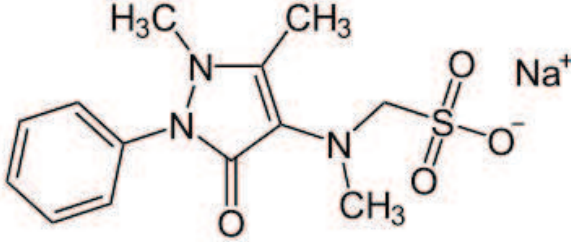
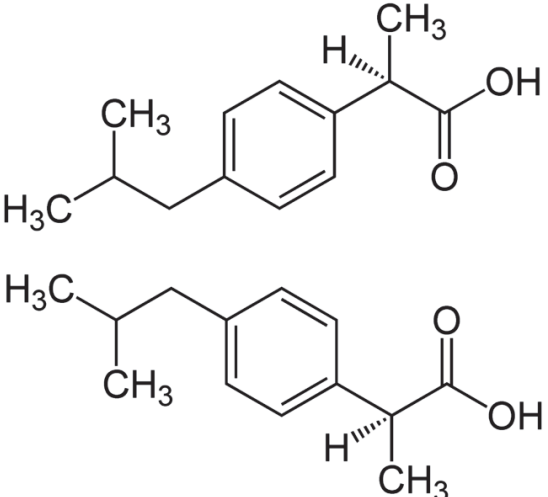
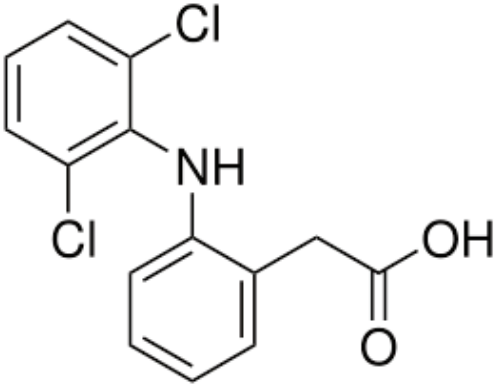
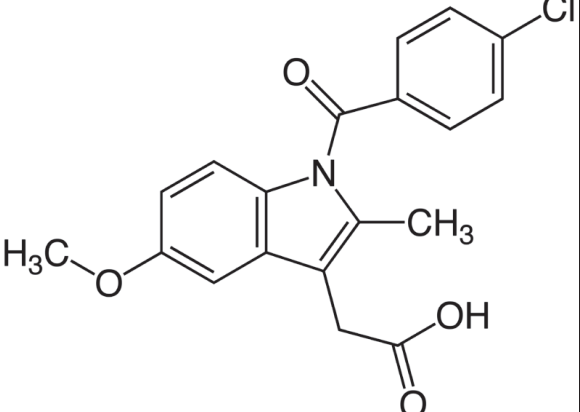
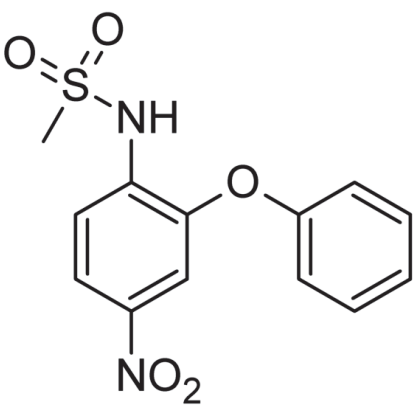
| | |
|--|---|
| <p>Piroxicam</p>  | <p>Ácido acetilsalicílico</p>  |
| <p>Paracetamol</p>  | <p>Dipirona sódica</p>  |
| <p>Ibuprofeno</p>  | <p>Diclofenaco</p>  |
| <p>Indometacina</p>  | <p>Nimesulida</p>  |

Tabela 3.2 os anti-inflamatórios não esteroides utilizados no trabalho.

4.6 CICLOOXIGENASES (COX)

São enzimas essenciais para a síntese de prostaglandinas a partir do ácido aracdônico (AA) liberado pelas fosfolipases A2 da membrana celular.

| | COX-1 | COX-2 |
|------------------|--|--|
| Classificação | Essencial nos processos fisiológicos | Induzida por processo inflamatório e Interleucinas (IL1, IL2 e TNF- α) |
| Vasos Sanguíneos | Relaxamento vascular (PGE1, PGI), e contração, aumento da permeabilidade capilar (PGF, TXA) | |
| Brônquios | Contração (PGF2, LTC, LTD, TXA) ou relaxamento (PGE) | |
| Rins (PGE1, PGI) | Mantém o fluxo sanguíneo renal em pacientes com ICC, insuficiência renal ou cirrose. Regula metabolismo de sódio e potássio. | Aumentam na privação do sal. Aumentam a formação de PGI2 e PGE2, que estimulam a secreção de renina. |
| Plaquetas | Indução da agregação plaquetária (TXA2) ou inibição (PGI). | Não é detectável. |
| Gestação/Parto | Induz a contração uterina (PGE, PGF2 α). | Possui expressão no epitélio uterino em diferentes períodos da gestação inicial e é importante na implantação do embrião e na angiogênese necessária para o estabelecimento da placenta. |
| SNC | Modulação do sistema neurovegetativo e do processo sensorial (PGE2, PGD2, PGH2). | Presente apenas no córtex, hipocampo, hipotálamo e medula espinhal. |
| Febre | Há produção de PGE2 que ativa o centro termorregulatório hipotalâmico. | Aumenta COX-2 no endotélio dos vasos cranianos e micróglia. |
| Hiperálgia | Potencializa a ação dos mediadores da dor e sensibiliza os nociceptores. | Aumenta a imunorreatividade para RNAm da COX-2. |
| Núcleo | | Induz apoptose. |

Tabela 3.3: Classificação das Ciclooxygenases. Fonte: Silva, P. Farmacologia. (2004)

4.6.1 AÇÃO DOS AINES SOBRE AS FOSFOLIPASES A2 SECRETÓRIAS

O modo de ação das drogas AINEs sobre PLA₂ secretórias ou mesmo citoplasmática são escassos e o papel destes compostos sobre a atividade ou função de PLA₂ secretórias pouco estudadas. Revisão propostas por Valentin et al., (1999), Six e Dennis (2000), Murakami e Kudo (2002) e Fuentes et al., (2002) mostram que as PLA₂ secretórias, podem mobilizar uma série de enzimas incluindo as PLA₂ citosólicas (Figura 3.4). Desta forma, as PLA₂ secretórias têm um papel pivotal em doenças inflamatórias (Figura 3.5), o que suscitou o seu uso como modelo de estudo para verificar a ação de vários compostos com potencial anti-inflamatório, flavonas e outros compostos polifenólicos (Chandra et al., 2002 a e b, Srinivasan et al., 2002, Singh et al., 2003 e Singh et al., 2005).

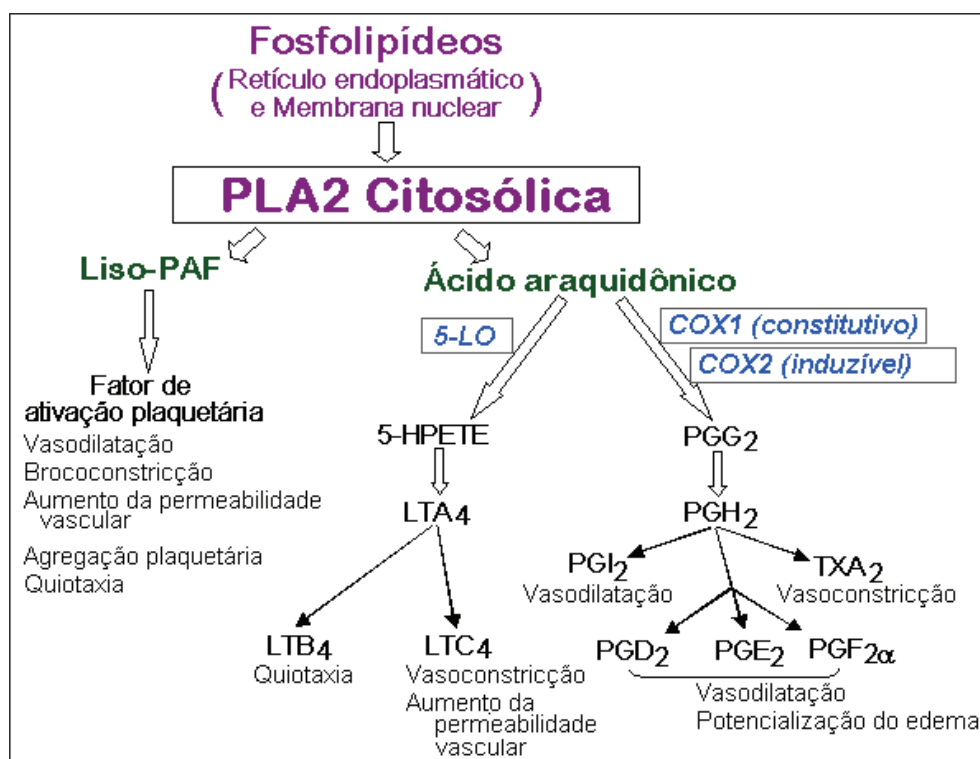


Figura 3.5. Atividade da PLA₂ citosólica e os produtos da degradação dos fosfolípidios de membrana. O Lisofosfolípido (Liso-PAF) é precursor do Fator de ativação plaquetária. O Ácido araquidônico sofre ação das Lipooxigenases (5-LO) e das Ciclooxigenases 1 e 2

(COX1 e COX2) produzindo Leucotrienos (LTA₄, LTB₄, LTC₄), Prostaglandinas (PGG₂, PGH₂, PGI₂, PGD₂, PGE₂, PGF₂ α) e Tromboxanos (TXA₂).

Trabalhos realizados por Singh et al, 2004 e 2005 mostram que determinadas drogas AINEs são capazes de interagir em diferentes sítios de PLA₂ de *Daboia russellii russellii*, que é uma PLA₂ altamente neurotóxica, estruturalmente pertencente a uma outra classe de PLA₂ IIB (PLA₂ neurotóxicas isoladas da família Viperidae) ou de PLA₂ de *Naja naja sp* (PLA₂, classe IA, fortemente neurotóxica). Ambas PLA₂ possuem estrutura e funções distintas das PLA₂ de *Crotalus* e *Bothrops*, PLA₂ classe IIA (PLA₂ miotóxicas, inflamatórias e isoladas de espécimes da família Crotalídea). Os estudos conduzidos por Singh et al., 2004 e 2005, sugerem que compostos AINEs com características hidrofóbicas podem interagir com a região hidrofóbica das PLA₂, mas, a inserção e as modificações induzidas a estrutura da PLA₂ dependem da interação destas drogas com determinados resíduos de aminoácidos. Outros dados sugerem que estas drogas de natureza hidrofílica podem interagir com o próprio cálcio, com resíduos de aminoácidos da alça de ligação do cálcio, com outras regiões como a asa beta. Contudo não existem dados ou estudos relacionando os AINEs com as PLA₂ classe IIA, que incluem as PLA₂ secretórias presentes nos fluidos corporais ou com PLA₂ secretórias de veneno de serpentes crotálicas (*Bothrops* e *Crotalus*).

4.7 FUNDAMENTOS TEÓRICOS.

As fosfolipases A₂ (PLA₂) constituem um importante grupo de moléculas com vários efeitos biológicos e farmacológicos. Essas moléculas podem atuar ativando ou reprimindo o metabolismo celular. As fosfolipases A₂ secretórias (PLA₂s) encontradas nos venenos de animais peçonhentos como as serpentes têm sido utilizadas como ferramentas

moleculares por viabilizarem estudos sobre diversos processos biológicos, entre eles: inflamação, neurotoxicidade, miotoxicidade e morte celular, entre outros.

Essas proteínas são encontradas em grupos de animais e plantas distintos, como é o caso de: cnidários marinhos, estrelas do mar e moluscos venenosos, como o *Conus SP.* Esses animais além de suas toxinas particulares, apresentam as PLA₂s semelhantes as de classe I, II ou III (Six D.A, Dennis E.A. 2000). O fato de serem ubíquas reflete na importância biológica dessas moléculas que a priori não teriam uma função específica, porém, estão envolvidas em diversos efeitos fisiológicos.

As PLA₂s de mamíferos compreendem cerca de 10 diferentes isoenzimas que possuem, como no caso das PLA₂s de serpentes, uma alça de ligação ao cálcio e um sítio catalítico. Evidências cumulativas mostraram que várias destas PLA₂s possuem um papel crucial na regulação do metabolismo do ácido araquidônico (AA) e que a liberação de AA por estas PLA₂s classes II são influenciadas pela capacidade destas proteínas em interagir com membranas ricas em Heparina sulfatada proteoglicano e receptores específicos de PLA₂s (Murakami et al., 2002).

Outros estudos mostram que esta interação entre as PLA₂s do grupo II é um fator importante para o curso do processo inflamatório. PLA₂s pancreáticas pré-incubadas com o inibidor específico LY311727 apresentam redução da atividade enzimática, um decréscimo significativo da produção de Prostaglandina E2 (PGE2) e diminuição dos níveis de COX 2. (Bidgood et al. 2000)

Bidgood et al, (2000) sugerem a participação de PLA₂ no aumento dos níveis de COX2 e concomitante elevação da concentração de PGE2, sendo assim as PLA₂ teriam um importante papel na modulação de resposta imune. Estudos clínicos mostram um aumento da concentração de PLA₂ da classe II, em vários líquidos secretórios como fluido sinovial,

soro e secreção bronquial de paciente com quadro patológico de artrite, choque endotóxico, peritonite, psoríase, pancreatite aguda e no sofrimento respiratório (Vadas et al., 1989 e Pruzanski et al., 1991), que sugere um papel das PLA₂ II como moléculas mediadoras de vários processos inflamatórios agudos ou crônicos.

O uso de PLA₂ de serpentes é extremamente importante, uma vez que, estas moléculas possuem uma plataforma catalítica idêntica das PLA₂ de humanos, inclusive as que participam dos processos inflamatórios. Tanto as PLA₂ de serpentes crotálicas, quanto às botrópicas estão colocadas na mesma classe das PLA₂ humanas, pertencentes a PLA₂ classe I ou II e estão relacionadas às diversas patologias (Dennis, 1994, 1997, Valentin e Lambeau, 2000 e Six e Dennis, 2000). (Tabela 3.4)

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

Tabela 3.4. Características de um grupo maior de Fosfolipases A₂ (PLA₂).

A importância de proteínas e peptídeos com atividade tóxica proveniente do veneno de origem animal, de microrganismos ou vegetais, têm sido largamente utilizados no estudo dos mecanismos de ação e dos processos metabólicos, pois estes peptídeos interagem especificamente com receptores, inibindo ou estimulando várias funções celulares, constituindo-se portanto, em ferramentas moleculares valiosas dentro da fisiologia e farmacologia. As toxinas em geral, bem como as neurotoxinas em particular, têm também sido utilizadas como sondas com diferentes finalidades, como por exemplo, a síntese de novas drogas, 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).

Os AINEs constituem um grupo de medicamentos com ampla prescrição mundial, pois são agentes que auxiliam na terapia de vários processos patológicos visto que oferecem ação farmacológica anti-inflamatória, analgésica e antipirética como efeitos primários. Além disso, existem estudos que relatam a indução do processo apoptótico celular, e esta propriedade particular torna estes medicamentos terapêutica e experimentalmente utilizáveis, no tratamento de processos cancerígenos das mais variadas patologias.

Apesar de serem vendidos no Brasil de forma “livre” em drogarias, nos Estados Unidos da América e países da Europa são vendidos mediante prescrição médica, a população brasileira exposta a estes medicamentos, é bastante expressiva e o risco de desenvolvimento de reações adversas aumenta à medida que cresce o padrão de consumo destas substâncias.

Os conhecimentos da ação destes fármacos sobre a inflamação, também são significativos, principalmente a aguda. A atividade reside basicamente na inativação da via

das COX 1 ou COX 2, contudo não existem dados relevantes sobre a atuação destes compostos em PLA₂ tipo II, que são estruturalmente homólogas as PLA₂ humanas.

Apesar dos AINEs terem sido largamente empregados como ferramentas para elucidação das vias biossintéticas das prostaglandinas e ter promovido o ponto inicial para a síntese de novas drogas anti-inflamatórias, o uso ou a avaliação da interação molecular dos AINEs com PLA₂ secretórias é pouco descrito ou estudado. Nesta mesma linha de raciocínio outras drogas com potencial anti-inflamatório como flavonóides têm sido largamente utilizadas.

Iglesias et al., (2005), demonstrou a ação de flavonóides sobre a estrutura e função de PLA₂ isoladas de veneno de serpentes, evidenciando que os flavonóides podem modificar não somente a atividade biológica, mas também a atividade funcional destas enzimas. Outros trabalhos realizados por Chandra et al., 2002 a e b, Srinivasen et al., 2002, Singh et al., 2003, Singh, 2005 e Singh et al., 2005, mostram que compostos polifenólicos podem interagir de forma específica com PLA₂ modificando estrutura e gerando redução da atividade farmacológica destas PLA₂, principalmente na parte de inflamação.

Em relação aos salicilatos ou outras drogas AINES de uso comum, não existem estudos suficientes sobre a atuação destes compostos sobre a PLA₂ e como estas drogas estariam modulando a atividade biológica, farmacológica e funcional das PLA₂, principalmente sobre a inflamação. Projetos que envolvam estes estudos são potencialmente úteis para avaliar o efeito destes compostos sobre as PLA₂. A interpretação dos resultados obtidos nos estudos com PLA₂ de venenos em presença desta drogas, pode ser extrapolada para o modelo humano.

Do ponto de vista clínico, o uso de drogas terapêuticas utilizadas para o tratamento de várias desordens inflamatórias tem uma grande aplicabilidade imediata e neste projeto o

uso de AINES comerciais, dos princípios ativos normais ou modificados, sobre as PLA₂ de serpentes podem ser extremamente valiosos principalmente no entendimento da ação destas drogas sobre a estrutura e função das PLA₂. Estes estudos poderão fornecer subsídios valiosos para o desenvolvimento de outros AINES com potencial de interação específica com as PLA₂ de forma maximizada, minimizando alguns dos efeitos colaterais observados por estas drogas.

5 OBJETIVOS

O projeto teve como objeto de estudo as PLA₂ farmacologicamente ativas do veneno de *Bothrops leucurus* em presença de AINES. Para isso foi utilizado um conjunto de técnicas experimentais *in vitro* e *in vivo*, com a finalidade de demonstrar possíveis modificações nas características físico-químicas e respostas farmacológicas à PLA₂ de *Bothrops leucurus*.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 ANIMAIS

Foram utilizados para os ensaios biológicos e farmacológicos ratos machos Wistar (120-150g) e camundongos Swiss (18-20g) obtidos no biotério central da UNICAMP. Estes animais foram alojados, por pelo menos 5 a 7 dias, em câmaras climatizadas para bioterismo para um período de adaptação até o seu uso. A metodologia utilizada e o projeto proposto foram analisados e autorizados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal do Instituto De Biologia da Universidade Estadual de Campinas sob o certificado nº1320-1 de 22 de agosto de 2007.

6.2 VENENOS E REAGENTES

Os venenos de *Bothrops leucurus* (Figura 5.2) foram adquiridos do CETA-Centro de Extração de Toxinas Animais, fundado em 1999, com licença de funcionamento junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente de Recursos Renováveis (IBAMA) nº 2/35/1999/000545-1, na categoria de criadouro comercial.



Figura 5.2 *Bothrops leucurus*

As drogas AINES selecionadas foram utilizadas em sua fórmula comercial, e foram selecionadas dos distintos grupos de anti-inflamatórios produzidos e comercializados no Brasil, sendo o principal fator decisivo para esta seleção, a popularidade de cada medicamento.

As drogas selecionadas foram o Piroxicam, o ácido acetil salicílico, o paracetamol, a dipirona sódica, o ibuprofeno, o diclofenaco sódico, a indometacina e a nimesulida, totalizando oito AINES selecionados, nenhum AINES foi selecionado do grupo dos inibidores seletivos de COX 2, pois pela restrição na venda deste produto, este não é um grupo comumente utilizado.

A dose para utilização destes AINES foram calculadas segundo o formulário de Cálculo de Dosagem de Medicamento por Taxa Metabólica Animal (contribuição: Médico Veterinário Paulo A. N. Felipe), encontrado no site do Instituto de Biologia da Unicamp.

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

6.3 PURIFICAÇÃO DA PLA2

Estas proteínas foram inicialmente purificadas por uma combinação de procedimentos cromatográficos, através de cromatografia de exclusão molecular, de troca iônica e de fase reversa.

6.3.1 Cromatografia de exclusão molecular

20 mg do veneno total *Bothrops sp* foram homogeneizados em 200µL de tampão bicarbonato de amônio 0,1M, pH 7,9 até a sua completa dissolução. Esta solução de veneno foi então centrifugada a 2500g por 5 minutos para clarificação da solução. O sobrenadante obtido foi então aplicado à coluna pré-empacotada de exclusão molecular em sistema de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), em coluna Protein Pack SW 300 (0.78 x 30cm) (Waters) acoplada ao sistema HPLC - PDA 991 (Waters), que foi previamente

equilibrada com o tampão bicarbonato de amônio, pH 7,9, 0,2M, 60 minutos antes da aplicação da amostra. A eluição do material foi realizada a um fluxo constante de 0,2ml/min de AMBIC 0,2M e monitorada a uma absorbância de 280 nm. As frações coletadas em um coletor de frações automático Foxy 200 foram liofilizadas e guardadas a -20°C.

6.3.2 Cromatografia de Troca iônica em HPLC.

O veneno total foi purificado também em uma coluna de troca iônica Protein Pack SP 5PW (Waters). O sistema cromatográfico utilizado foi o sistema HPLC - PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B. Foram utilizados um injetor automático de amostras U6K com um “loop” de 1,0mL e uma Protein Pack SP 5PW (0,78 X 8 cm), previamente equilibrada com tampão Bicarbonato de Amônio 0,05M, pH 7,9. A eluição das amostras das isoformas das neurotoxinas foi realizada usando um gradiente linear com Bicarbonato de Amônia 1,0M, pH 7,9. As frações foram monitoradas a 280 nm, coletadas, liofilizadas e estocadas a -20°C.

6.3.3 Cromatografia de fase reversa em HPLC

Nas etapas anteriores, concomitantes ao fracionamento, foram também realizados experimentos para a caracterização fosfolipásica do veneno e de suas frações ao longo da corrida cromatográfica. O sistema cromatográfico utilizado foi o HPLC - PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, um injetor automático de amostras U6K com um “loop” de 200 µL e uma coluna µ-Boundapak C-18 (0,78 X 30 cm preparativa Waters), previamente equilibrada com Tampão A (ácido trifluoroacético 0,1% em água, pH 3,5), que também é utilizado para a homogeneização das amostras.

A corrida cromatográfica foi feita usando um gradiente de concentração de tampão B (acetonitrila 66%, em tampão A), o fluxo foi mantido em 1mL/min e o monitoramento do

cromatograma foi realizado a 280nm. As frações coletadas foram liofilizadas e posteriormente armazenadas a -20 °C.

6.3.4 Análise do grau de purificação da toxina:

O grau de homogeneidade molecular foi avaliado por dois métodos, HPLC de Fase reversa e Eletroforese. Em HPLC de fase reversa, foi usada uma coluna C18 analítica (0.39 x 30 cm, Supelco ou Waters), previamente equilibrada durante 10 minutos, com uma solução de ácido trifluoroacético a 0,1% (TFA, 0,1%) previamente filtrado em filtro 0,22mm. As amostras liofilizadas foram dissolvidas em 250ml de TFA 0,1%, que foi então centrifugada a 4500xg por 5 minutos, o sobrenadante obtido então aplicado na coluna cromatográfica. Para eluição da fração foi usado um gradiente linear contínuo do solvente B (Acetonitrila 66% em solvente A). O registro da corrida cromatográfica foi realizado a 280 nm.

O segundo método utilizado para avaliação do grau de homogeneidade molecular foi o de eletroforese em PAGE-SDS realizado segundo Laemmli 1970.

6.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA TESTE

Quatro condições foram definidas para a realização de todos os testes. Na primeira condição os testes foram realizados com as amostras de AINES e PLA₂ em condições nativas. A segunda condição estabelecida foi a utilização de PLA₂ e AINES não incubado, nesta condição, a amostra de PLA₂ foi utilizada juntamente com a amostra de AINES. A terceira condição foi utilizada para os testes in vivo, as amostras de AINES foram injetadas no peritônio dos animais. A quarta condição foi PLA₂ incubada com AINES.

Para a condição de PLA₂ incubada com AINES, cada anti-inflamatório foi incubado individualmente com PLA₂ por 30 min a 37 °C, para tentar promover ligação entre PLA₂ e

AINES. Os produtos destas incubações foram submetidos à nova cromatografia em uma coluna C18 analítica (0.39 x 30 cm, Supelco ou Waters) acoplada a um sistema de HPLC, com os seguintes tampões: Água com 0,1% de TFA (Tampão A) e 66,6% de ACN em Tampão A (Tampão B). Para a obtenção de PLA₂ e retirada dos AINES não ligados a esta PLA₂

Os sais e outros contaminantes foram eluídos no início da corrida com 0% de tampão B, e o pico de PLA₂ foi novamente isolado.

O preparo destas amostras foi realizado observando a dose estabelecida de cada AINES, para que não houvesse diferença de concentração nas amostras utilizadas nos testes.

6.5 ELETROFORESE EM PAGE-SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida, também utilizado para avaliar o grau de purificação da amostra, foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por Laemmli (1970).

6.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A₂

A determinação da atividade fosfolipásica A₂ foi realizada segundo o método descrito por Holzer e Mackessy (1996) e adaptado para placa de ELISA com 96 poços de acordo com o método descrito por Beghini et al. (1999), utilizando-se como substrato o ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico (NOBA ou 4N3OBA). Foram utilizadas amostras com uma concentração de 1,0 mg/ml de amostra, no caso do veneno total e fosfolipase A₂ isolada. As amostras foram incubadas a 37° C junto com o substrato, tampão de reação

(Tris-HCl 0,1M Ca^{2+} 0,01M pH 8) e lidas a 425 nm após 20 minuto. A reação e leitura foram feitas em leitor de placa de multicanal (Spectramax 340).

Após a confirmação da atividade fosfolipásica A2, os demais ensaios farmacológicos foram realizados com o substrato cromogênico NOBA, seguindo os protocolos previamente definidos.

6.7 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA PLA₂.

Nesta parte do protocolo experimental, foram realizados experimentos para determinar as melhores condições experimentais para a máxima atividade da PLA. Para isso, foram realizados protocolos incubando a enzima em presença do substrato. Este tempo de incubação variou de 0 minutos a 40 minutos e a leitura dos resultados foi feita a cada 5 minutos.

6.8 ATIVIDADE MIOTÓXICA

A creatina quinase é responsável por catalisar a transferência reversível do grupo N-fosforil da fosfocreatina para uma molécula de ADP regenerando ATP e formando creatina. Nos últimos anos, essa enzima vem sendo muito utilizada como indicador bioquímico na ocorrência de lesão muscular, e sua presença no plasma sanguíneo sugere a existência de uma elevada agressão sobre as fibras musculares (Barbosa et al., 2003).

Para determinar os níveis séricos de Creatinina quinase (CK) foi utilizado o Kit para determinação de CK-NAC (Cat. N° 01300) laborlab, tanto nos animais tratados com as frações, bem como nos animais controle. Foram utilizados 15 animais pesando entre 35 e 40,0g divididos em cinco grupos (Controle, PLA2, AINES, AINES não incubado com PLA2 e PLA2 + AINES injetado no peritônio), de três animais, que foram inoculados

intramuscularmente 25,0 μ l (2,0 μ g/ μ l de PBS) da fração de PLA₂ no músculo gastrocnemius direito. Após 3 horas, o sangue dos animais foi colhido da veia caudal e colocado em banho-maria para a preparação do soro, segundo indicação do fabricante do Kit utilizado. Os animais controle (n = 3) foram submetidos ao mesmo procedimento dos animais tratados, somente inoculada com 25,0 μ l de PBS. Após a adição dos reagentes ao soro diluído, as amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C, por 5 minutos. As leituras (a 365nm) foram realizadas em intervalos de 1 minuto. A atividade foi expressa como unidade por litro (U/L).

6.9 EDEMA DE PATA

Foram utilizados 15 camundongos swiss (35-40g), divididos em cinco grupos de três animais, os animais foram anestesiados com halotano e submetidos à injeção subplanar (0,025g/pata) de PLA₂ isolada de *B. leucurus*. Todas as drogas utilizadas foram solubilizadas em solução salina estéril (0,9%). O volume da pata é medido antes das injeções e após intervalos de tempo pré-estabelecidos, utilizando-se um hidropletismógrafo (modelo 7150, Ugo Basile, Itália). Os resultados foram expressos como aumento do volume da pata (%), calculado por subtração do volume basal. Em alguns casos, a área sob a curva (AUC) da formação de edema contra o tempo (mL x min) é calculada usando o método trapezoidal.

6.10 EDEMA DE PELE

A medida do edema de pele foi realizado segundo SILVA et al. (2005). Foram utilizados 15 animais pesando entre 35 e 40,0g divididos em cinco grupos de três animais. Após a depilação do dorso do animal foi injetada amostra de PLA₂ nativa e PLA₂

incubadas. Os animais que receberam PLA₂ nativa foram tratados com 25µL de AINES intraperitoneal. Os agentes em teste foram preparados em solução salina estéril e injetados subcutaneamente (em triplicata) em volume de 25µL na pele dorsal. Após 30 min, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, a pele dorsal removida e os sítios injetados (delimitados pelo extravasamento de sangue) foram cortados com instrumento circular cortante (15mm de diâmetro) e o peso determinado por balança analítica. O edema foi medido pela subtração do peso da pele que recebeu apenas o veículo, daquele que recebeu o agente irritante. A percentagem de inibição do edema foi calculada pela subtração do peso da pele do grupo controle, pelo peso da pele do grupo teste, dividindo-se pelo grupo controle, multiplicando-se por 100. A diminuição da atividade hemorrágica foi avaliada pela medida do halo (mm).

6.11 ATIVIDADE DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

A) Preparo da solução de plaquetas

Para este ensaio foi coletado sangue de voluntários sadios, através da utilização da estrutura e pessoal do Hemocentro da UNICAMP, que não tomaram medicamento algum por 15 dias. O sangue foi colocado em tubos plásticos contendo citrato de sódio 3,8% (1:10 v/v), e centrifugado a 200 x g por 15 minutos à 25°C, para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), enquanto que o plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido centrifugando-se o sangue remanescente a 800 x g por 15 min à 25°C. Para preparar as plaquetas lavadas, o PRP foi centrifugado a 800 x g por 12 min, na presença de 9µL de iloprost (8 nM), um análogo da prostaciclina. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado de plaquetas foi ressuspenso em solução de Krebs livres de Ca²⁺ e centrifugado a 200 x g; o processo foi repetido por mais duas vezes (Radomski e Moncada, 1983). Após a lavagem,

as plaquetas (50µl) foram incubadas em tubos do tipo eppendorf com 950 µl de oxalato de amônio 1% por 10 min., e a contagem de plaquetas foi feita em Câmara de Neubauer, ajustada para 3×10^8 plaquetas/ ml. Cloreto de Cálcio (1 mM) foi adicionado à suspensão final das plaquetas. O sangue para obtenção das PL continha ACD-C (124 mmol/L Na₃-citrato, 130 mmol/L ácido cítrico e 110 mmol/L glicose) (1:10, v/v).

B) Medida da Agregação Plaquetária.

A medida de agregação foi realizada usando-se um agregômetro de dois canais (Payton Scientific Instruments, Inc, Buffalo, NY). Para o PRP o aparelho foi calibrado contra PPP, que apresentou 100% de agregação, determinando-se um pico máximo de agregação. O PRP representou 0% de agregação, determinando-se uma linha de base. Com isso, foi possível determinar uma amplitude para o registro de agregação deste plasma. Para as PL (0%), a calibração foi realizada contra solução de Krebs (100%). Uma suspensão de PRP (400 µl) foi mantida sob agitação constante (900 rpm) no agregômetro em cuvetas à 37°C. Os experimentos de agregação foram realizados em triplicatas, e foram utilizadas concentrações crescentes das proteínas purificadas do veneno total de *Bothrops leucurus* (PLA₂). Como controles positivos para a agregação foram utilizados ATP (PRP) e trombina.

6.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

7 RESULTADOS

7.1 PURIFICAÇÃO DA PLA₂

7.1.1 ANÁLISE DO VENENO TOTAL EM HPLC DE EXCLUSÃO MOLECULAR.

Aproximadamente 20mg do veneno total de *B. leucurus* foi dissolvido em 200µL de solução de bicarbonato de amônia 0,2 M pH 7,8, clarificado por centrifugação. A eluição das frações dos venenos foi realizada fazendo uso de tampão AMBIC 0,2M pH 7,8. A fração com maior atividade fosfolipásica corresponde a Fração F (Figura 6.1).

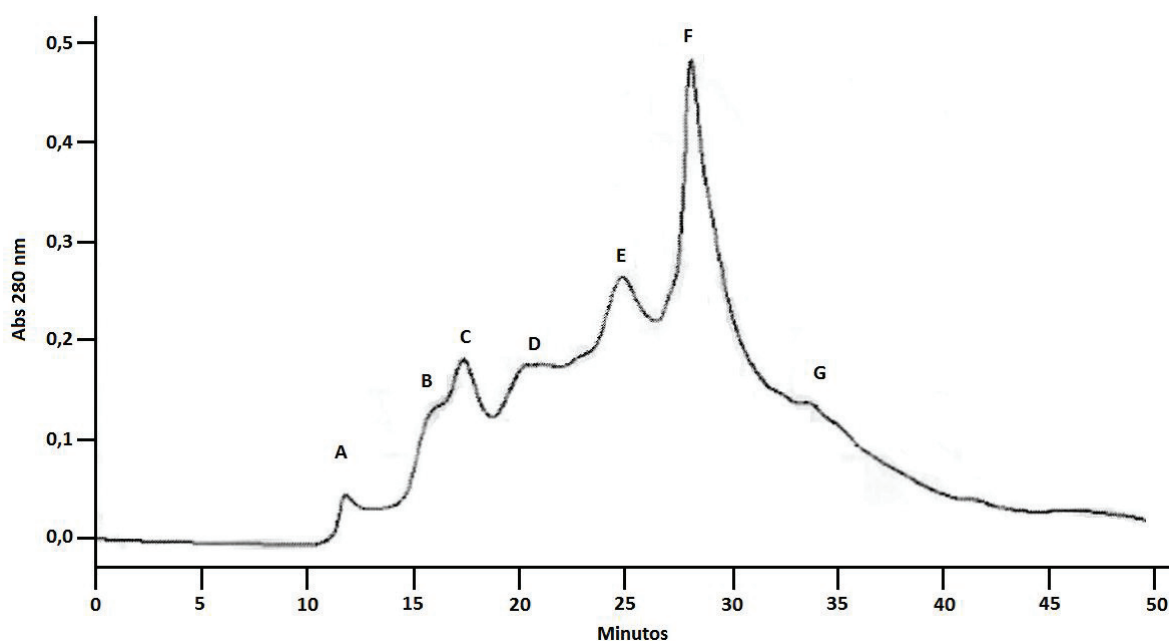


Figura 6.1: Perfil cromatográfico do fracionamento do veneno total de *Bothrops leucurus* através de cromatografia de Exclusão Molecular TSK Gel G3000SW

7.1.2 ANÁLISE DO VENENO TOTAL EM HPLC DE TROCA IÔNICA.

Aproximadamente 20mg do veneno total de *B. leucurus* foi dissolvido em 200µL de solução de bicarbonato de amônia 0,05 M pH 7,8, clarificado por centrifugação. A eluição das frações dos venenos foi realizada fazendo uso de um gradiente linear de concentração

de solvente B (Ambic 0,5m) em solvente A (Ambic 0,05M) A fração com maior atividade fosfolipásica corresponde a Fração 3 (Figura 6.2).

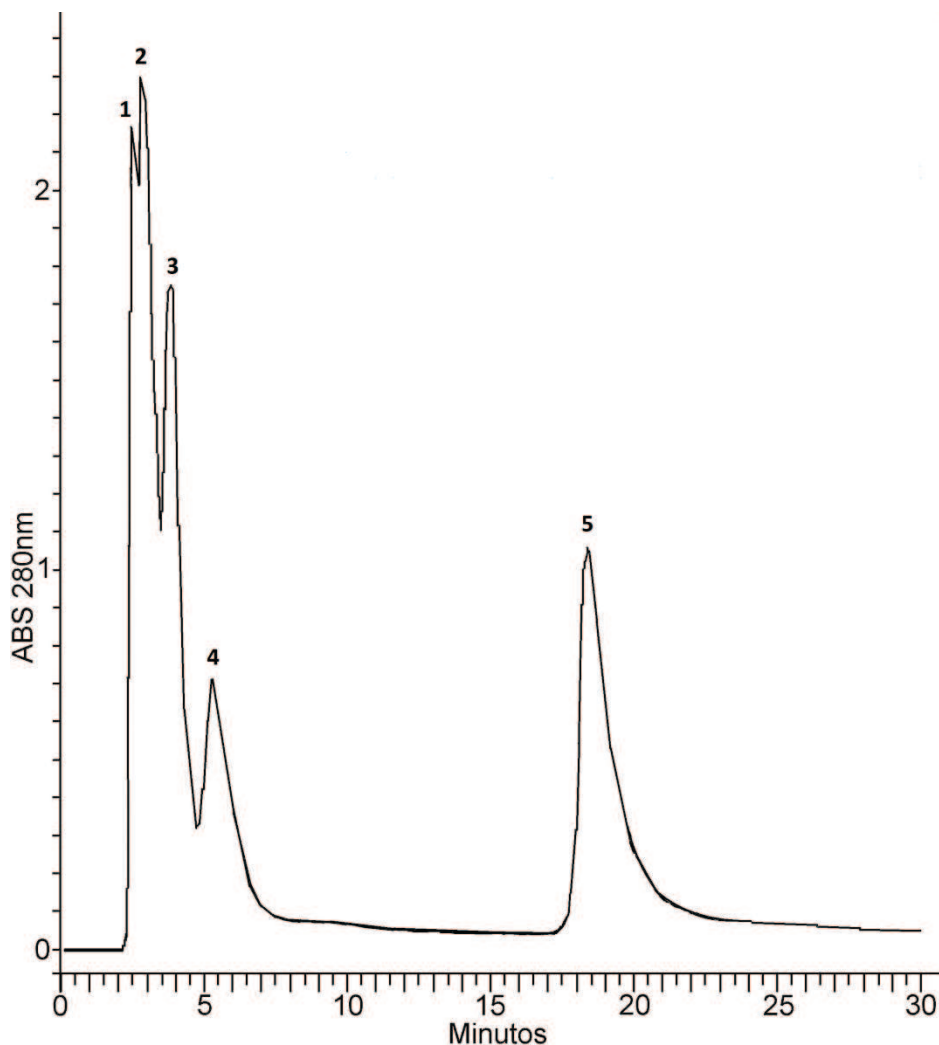


Figura 6.2:Perfil cromatográficos do fracionamento do veneno total de *Bothrops leucurus* através de cromatografia de troca iônica em coluna protien pack SP- 5pw.

7.1.3 ANÁLISE DO VENENO TOTAL EM HPLC DE FASE REVERSA.

Aproximadamente 20mg do veneno total de *B. leucurus* foi dissolvido em 200µL de solução de bicarbonato de amônia 0,2 M pH 7,8, clarificado por centrifugação. A eluição das frações dos venenos foi realizada fazendo uso de um gradiente linear de concentração de solvente B (acetonitrila 66%) em solvente A (TFA 0,1%). As frações que correspondiam

às PLA₂s foram destacadas e corresponderam, conjuntamente, a aproximadamente 30 % das proteínas totais para o veneno de *Bothrops leucurus* (Figura 6.3).

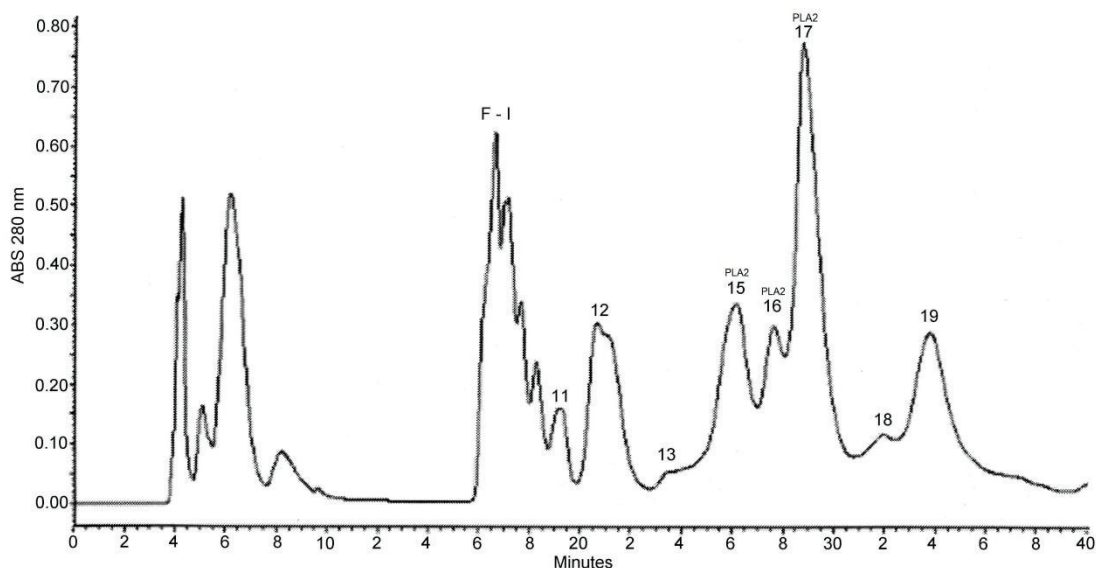


Figura 6.3. Perfil cromatográficos do fracionamento do veneno total de *Bothrops leucurus* através de cromatografia de HPLC, utilizando coluna de Fase Reversa (C-18 u-Bondapack 0,78 x 30 cm - Waters) e λ 280nm, evidenciando os picos de 15, 16 e 17 de fosfolipase A2 (PLA₂).

7.1.4 ATIVIDADE ESPECIFICA PARA PLA₂

A atividade específica para PLA₂ foi encontrada em diferentes picos oriundos das cromatografias de fase reversa, troca iônica e exclusão molecular, (Figura 6.4). Esta atividade foi testada para identificar e determinar a melhor forma de purificar a proteína desejada. Comparando-se os dados dos perfis cromatográficos do veneno total de *Bothrops leucurus* e os resultados referentes à purificação através de cromatografia em coluna de exclusão molecular (Protein Pack SW 300 0,78 x 30 cm – Waters) e cromatografia em coluna de troca iônica (Protein Pack SP 5PW Waters), resultaram em menor grau de pureza e atividade quando comparado aos resultados obtidos com a coluna de fase reversa (C-18 u-Bondapack 0,78 x 30 cm – Waters), que apresentou melhor resultado, quanto à atividade específica, rendimento e separação das isoformas. Razão pela qual optamos por utilizar

apenas um passo cromatográfico em coluna de fase reversa, sendo que a fração 17 foi escolhida para dar continuidade aos experimentos, em razão do seu maior rendimento e atividade específica.

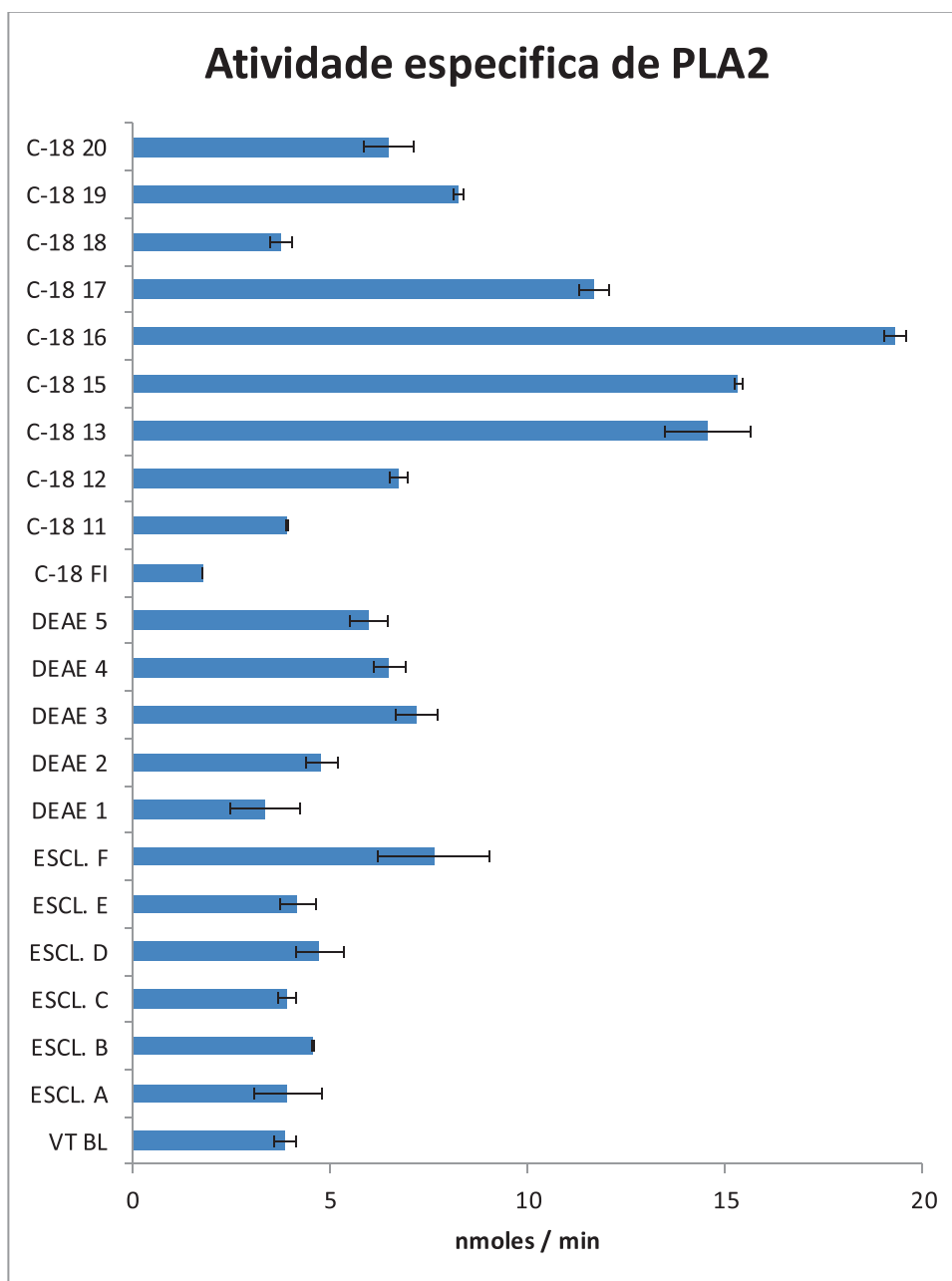


Figura 6.4. Comparação da atividade específica para PLA₂ em cada pico proveniente das Cromatografias de fase reversa (C-18), troca iônica (DEAE), exclusão molecular (ESCL) e Veneno total (VT BL). Pode-se observar que os picos 15, 16, 17 e 18, oriundos da cromatografia de fase reversa, possuem maior atividade enzimática.

7.1.5 CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA

Após o fracionamento com o veneno, a fração contendo maior relação rendimento / atividade foi purificada por HPLC utilizando coluna de Fase Reversa.

A fração F17 foi então repurificada, usando-se nova cromatografia em HPLC de fase reversa, utilizada para demonstrar o grau de pureza do pico escolhido para dar continuidade ao experimento.(Figura 6.5)

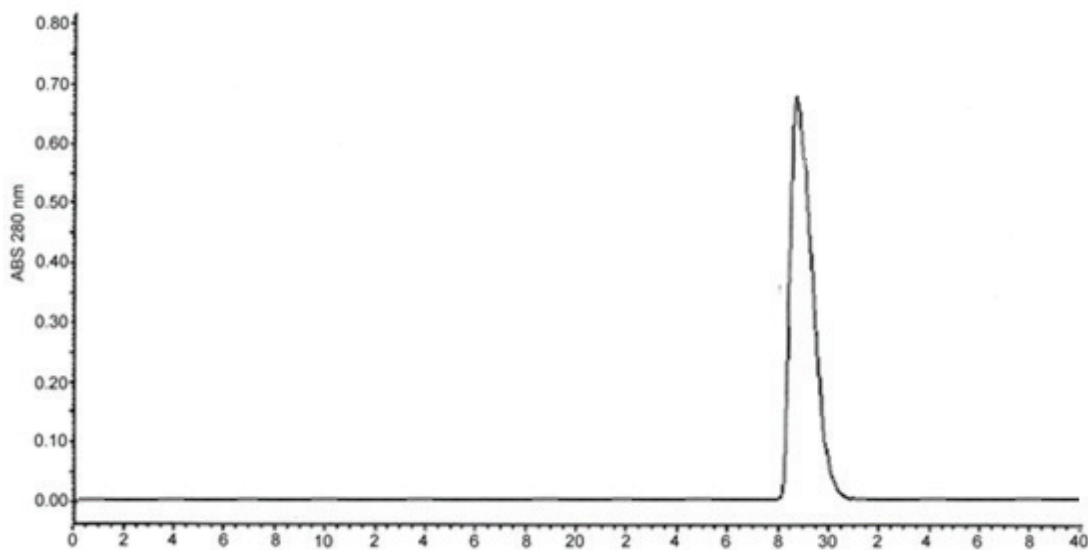


Figura 6.5: Cromatografia do pico 17 proveniente de cromatografia em sistema de HPLC utilizando coluna de fase reversa C18 μ -Boundapak. Cálculo da dose dos medicamentos.

7.2 CÁLCULO DE DOSAGEM DE MEDICAMENTO

| | | | | | |
|----------------------------|-------|-------------|--|---------|-------------|
| AMOSTRA 1 Ácido enólico | | | AMOSTRA 2 Salicilato | | |
| MEDICAMENTO Piroxicam | | | MEDICAMENTO Ácido acetil salicílico | | |
| Espécie | homem | camundongo | Espécie | homem | camundongo |
| Const. Metabolica | 70,00 | 70,00 | Const. Metabolica | 70,00 | 70,00 |
| Peso kg | 70,00 | 0,03 | Peso kg | 70,00 | 0,03 |
| Dose mg | 40,00 | 0,10 | Dose mg | 1000,00 | 2,60 |
| Dose mg/kg | 0,57 | 4,16 | Dose mg/kg | 14,29 | 103,92 |
| Freq. em 24 h | 1,00 | 7,27 | Freq. em 24 h | 4,00 | 29,10 |
| T.M.E. | 24,20 | 176,04 | T.M.E. | 24,20 | 176,04 |

| | | | | | |
|-------------------------------|--------|-------------|--------------------------------|---------|-------------|
| AMOSTRA 3 P-aminofenolicos | | | AMOSTRA 4 Pirasolonicos | | |
| MEDICAMENTO Paracetamol | | | MEDICAMENTO Dipirona sódica | | |
| Espécie | homem | camundongo | Espécie | homem | camundongo |
| Const. Metabolica | 70,00 | 70,00 | Const. Metabolica | 70,00 | 70,00 |
| Peso kg | 70,00 | 0,03 | Peso kg | 70,00 | 0,03 |
| Dose mg | 750,00 | 1,95 | Dose mg | 1000,00 | 2,60 |
| Dose mg/kg | 10,71 | 77,94 | Dose mg/kg | 14,29 | 103,92 |
| Freq. em 24 h | 5,00 | 36,37 | Freq. em 24 h | 4,00 | 29,10 |
| T.M.E. | 24,20 | 176,04 | T.M.E. | 24,20 | 176,04 |

| | | | | | |
|-------------------------------|---------|-------------|-----------------------------------|--------|-------------|
| AMOSTRA 5 Ácido propionico | | | AMOSTRA 6 Ácido arilo acético | | |
| MEDICAMENTO Ibuprofeno | | | MEDICAMENTO Diclofenaco sódico | | |
| Espécie | homem | camundongo | Espécie | homem | camundongo |
| Const. Metabolica | 70,00 | 70,00 | Const. Metabolica | 70,00 | 70,00 |
| Peso kg | 70,00 | 0,03 | Peso kg | 70,00 | 0,03 |
| Dose mg | 1200,00 | 3,12 | Dose mg | 150,00 | 0,39 |
| Dose mg/kg | 17,14 | 124,70 | Dose mg/kg | 2,14 | 15,59 |
| Freq. em 24 h | 2,00 | 14,55 | Freq. em 24 h | 1,00 | 7,27 |
| T.M.E. | 24,20 | 176,04 | T.M.E. | 24,20 | 176,04 |

| | | | | | |
|----------------------------------|--------|-------------|---------------------------|--------|-------------|
| AMOSTRA 7 Ácido indol acético | | | AMOSTRA 8 Outros | | |
| MEDICAMENTO Indometacina | | | MEDICAMENTO Nimesulida | | |
| Espécie | homem | camundongo | Espécie | homem | camundongo |
| Const. Metabolica | 70,00 | 70,00 | Const. Metabolica | 70,00 | 70,00 |
| Peso kg | 70,00 | 0,03 | Peso kg | 70,00 | 0,03 |
| Dose mg | 200,00 | 0,52 | Dose mg | 100,00 | 0,26 |
| Dose mg/kg | 2,86 | 20,78 | Dose mg/kg | 1,43 | 10,39 |
| Freq. em 24 h | 1,00 | 7,27 | Freq. em 24 h | 2,00 | 14,55 |
| T.M.E. | 24,20 | 176,04 | T.M.E. | 24,20 | 176,04 |

Tabela 6.7: Dosagem de Medicamento por Taxa Metabólica Animal. Piroxicam 0,1mg,, ácido acetil salicílico 2,6 mg, paracetamol 1,95mg, dipirona sódica 2,6mg, ibuprofeno 3,12mg, diclofenaco sódico 0,39mg, indometacina 0,52mg e nimesulida 0,26mg

7.3 ANÁLISE DE PLA₂ POR ESPECTRO UV-VISIVEL EM HPLC

O pico 17 de PLA₂ de *Brothops leucurus* foi tratado com as amostras de 1 a 8, e nova cromatografia de fase reversa foi utilizada para demonstrar a ligação de entre PLA₂ e amostras e a integridade molecular das amostras e PLA₂, após incubação de 60min a 37 °C.

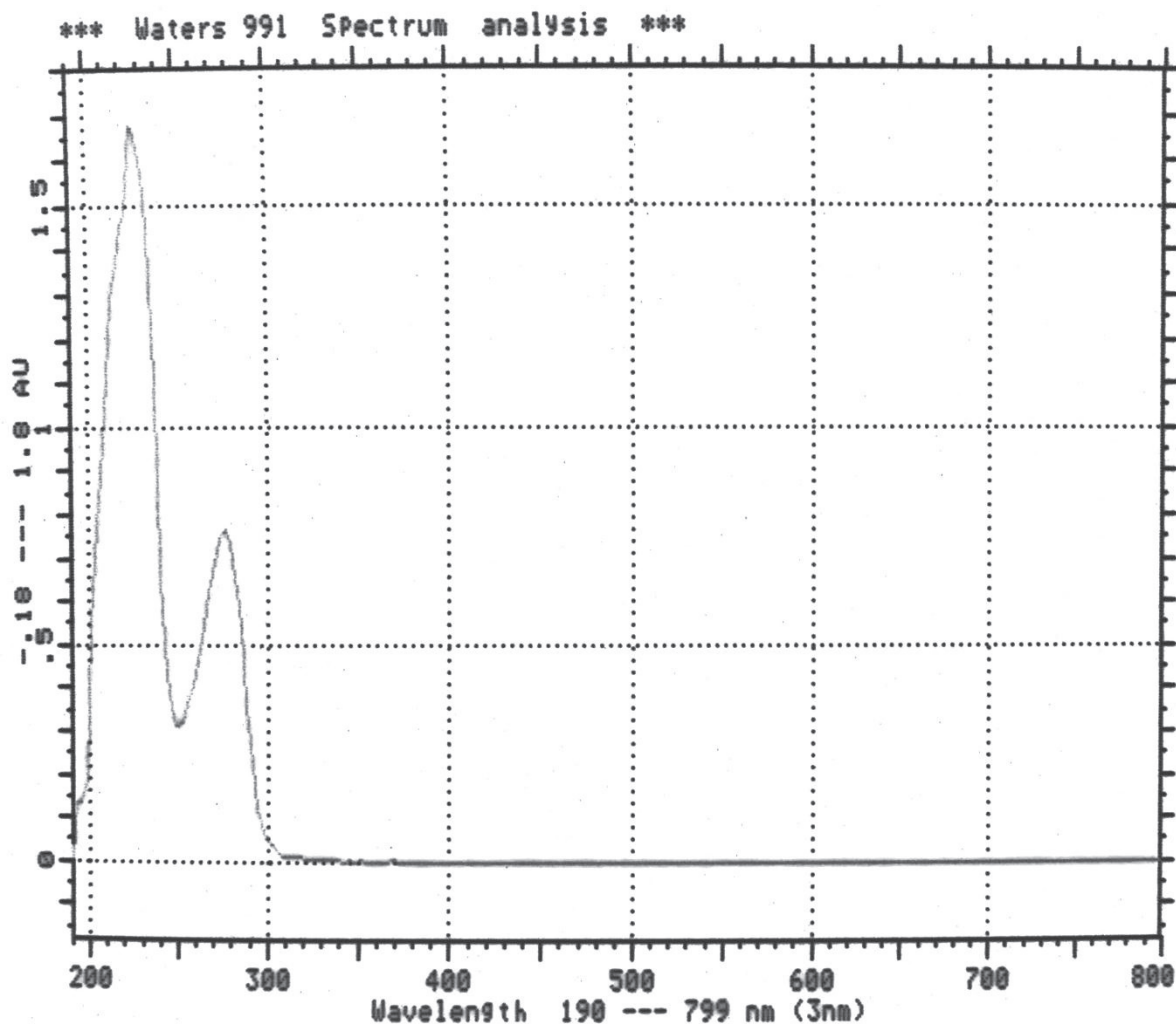


Figura 6.8:Espectro UV-Vis da PLA₂ F17

Após analisarmos todos os espectros, não foi possível identificar, em nenhum dos perfis, modificação que permita afirmar que alguma das amostras é capaz de se ligar à PLA₂ nas condições de incubação utilizadas. Pôde-se observar também que a PLA₂ e as amostras de 1 a 8 mantiveram sua integridade e característico perfil cromatográfico nas três

condições testadas (PLA₂ pura, Amostras Puras, PLA₂ + Amostras não incubadas e PLA₂ + Amostras incubadas.

7.4 ELETROFORESE EM SDS-PAGE

O veneno total e suas isoformas de PLA₂ foram submetidos à análise em PAGE-SDS com DTT. Os marcadores de massa molecular utilizados foram: fosforilase b (94 KDa), BSA (67 KDa), ovoalbumina (43 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 KDa) e α -lactoalbumina (14,4 KDa). Na figura 6.9 foram mostrados os perfis de massa molecular em PAGE-SDS a 12,5% do veneno de *Bothrops leucurus* e sua fração 17 de PLA₂ em presença de DTT. A análise eletroforética do veneno mostrou que a PLA₂ possui massa aproximada de 14 kDa (Figura 6.9)

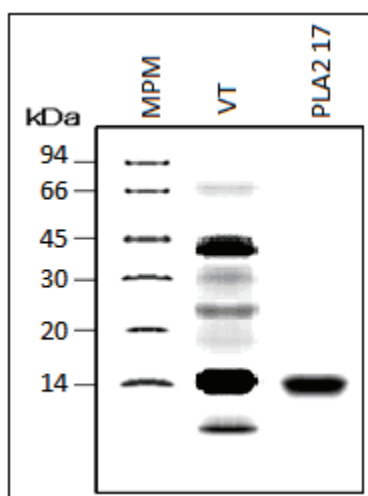


Figura 6.9. Perfil eletroforético do veneno de *Bothrops leucurus* e Fosfolipases A2 (PLA₂-17) em PAGE-SDS 12.5%.MPM- Padrão de massa molecular, VT- Veneno total – PLA₂ 17 Phospholipase A2 pico 17. Todas as demais eletroforeses mostraram uma única banda de peso aproximado em 14 kDa.

7.5 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA PLA₂.

Após o isolamento e incubação da PLA₂ com os AINES, foi testada a atividade catalítica da enzima, utilizando o 4N3OBA como substrato. Na Figura 6.10 observou que as

amostras individualizadas não resultaram em atividade significativa, quando comparadas com a atividade apresentada pela PLA₂. A figura 6.11 mostrou a atividade de PLA₂ não incubada com as amostras de AINES, e pôde-se observar que, com exceção da amostra 6, que apresentou diminuição da atividade catalítica ao final do experimento, a utilização das demais frações resultaram em um aumento expressivo da atividade catalítica ao final do experimento, no tempo 40 min. A figura 6.12, entretanto, mostrou o resultado da atividade cinética de PLA₂ incubada com os AINES, após cromatografia de fase reversa utilizada para retirar o excesso de AINES não ligado a PLA₂. Pudemos observar neste gráfico único que não ocorreu mudança na atividade da PLA₂ incubada, uma vez que não ocorreu ligação entre PLA₂ e os AINES.

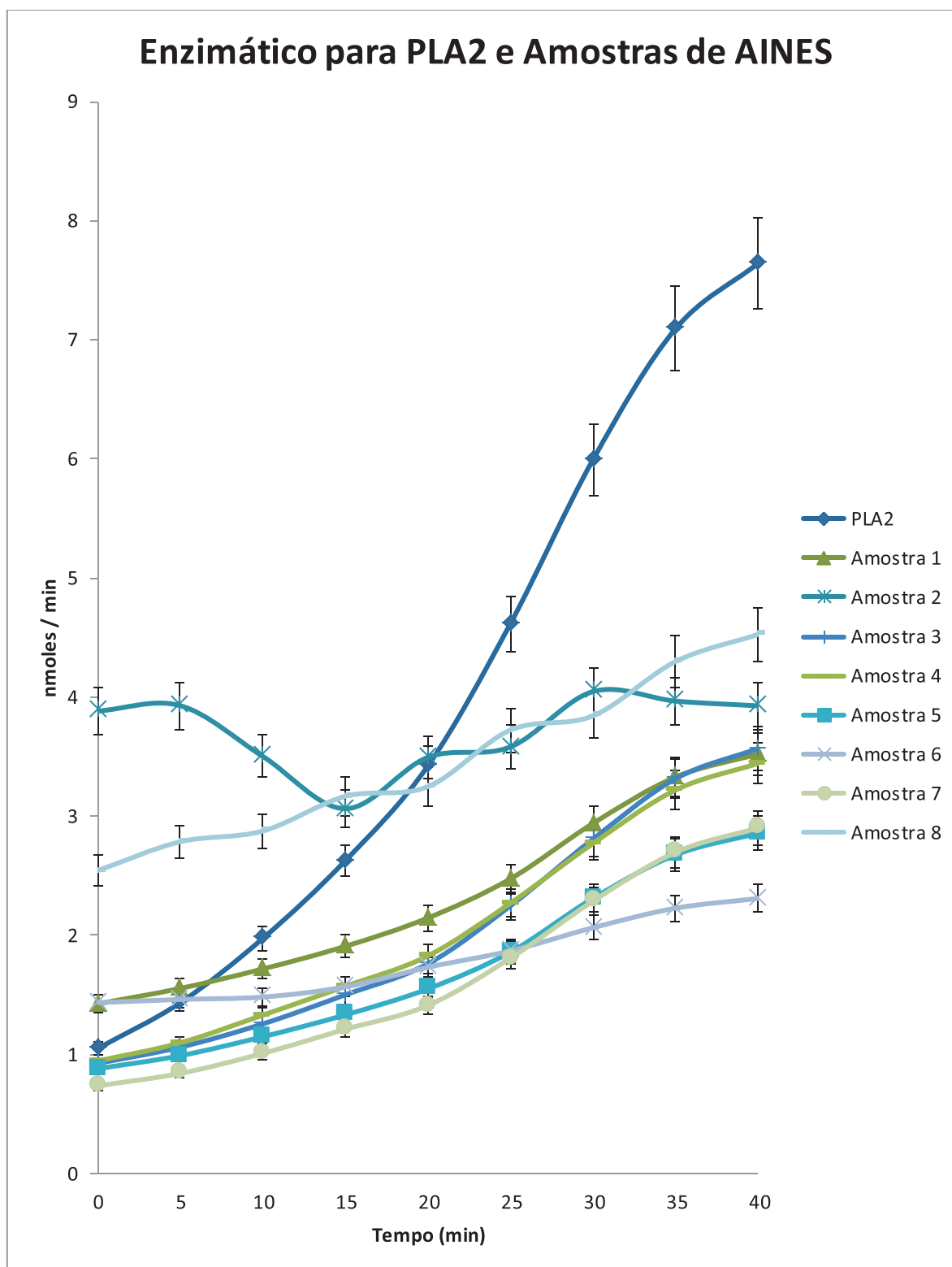


Figura 6.10. Ensaio de atividade cinética enzimática com substrato sintético específico para PLA₂ (4NOBA). A PLA₂ apresenta uma curva característica para a atividade enzimática, pela variação do n° de moles/min.

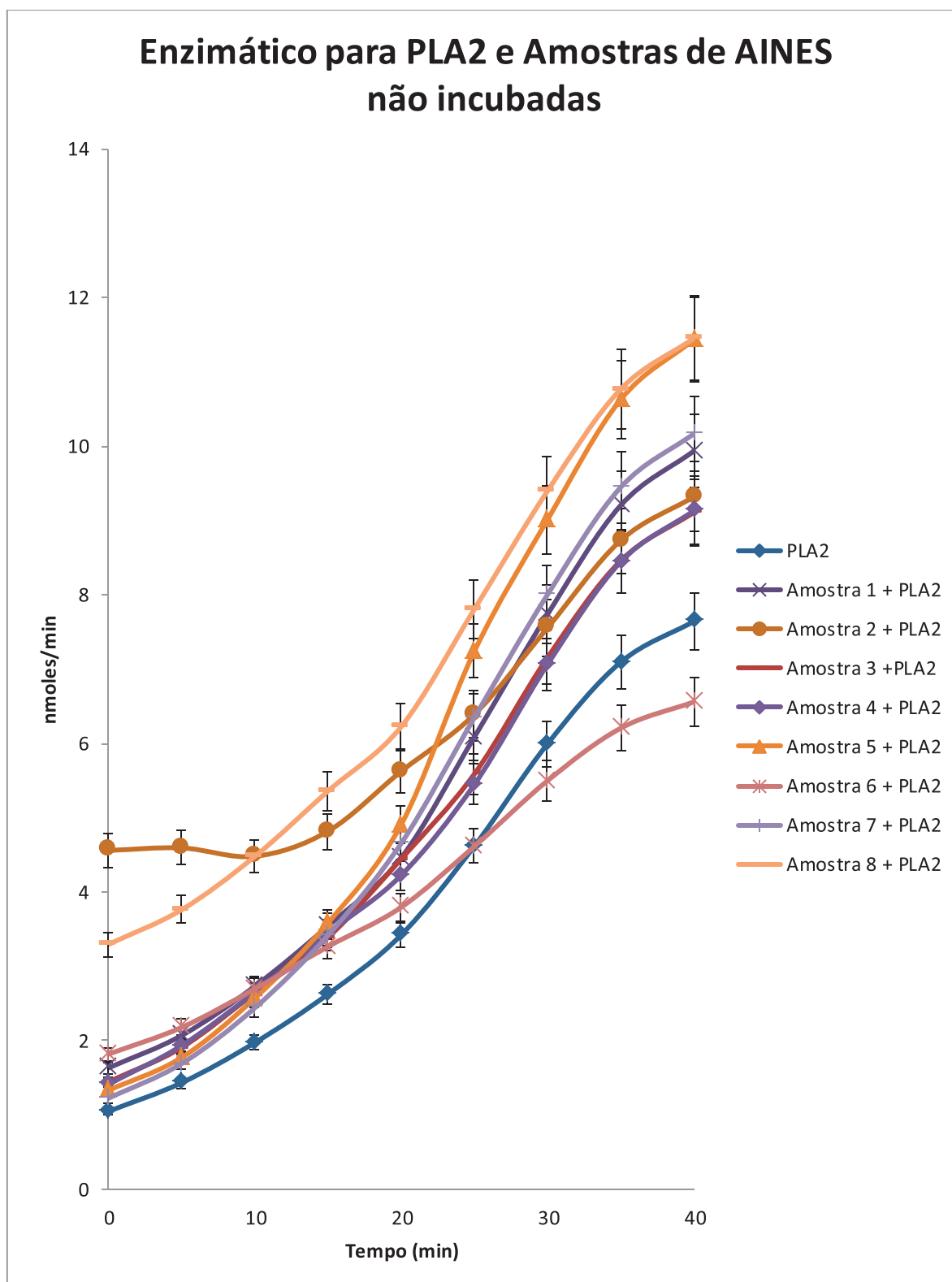


Figura 6.11: Avaliação da interação e ou interferência dos AINES sobre a atividade cinética da PLA₂, avaliada pela diferença de absorbância provocada pela quebra do substrato 4N3OBA.

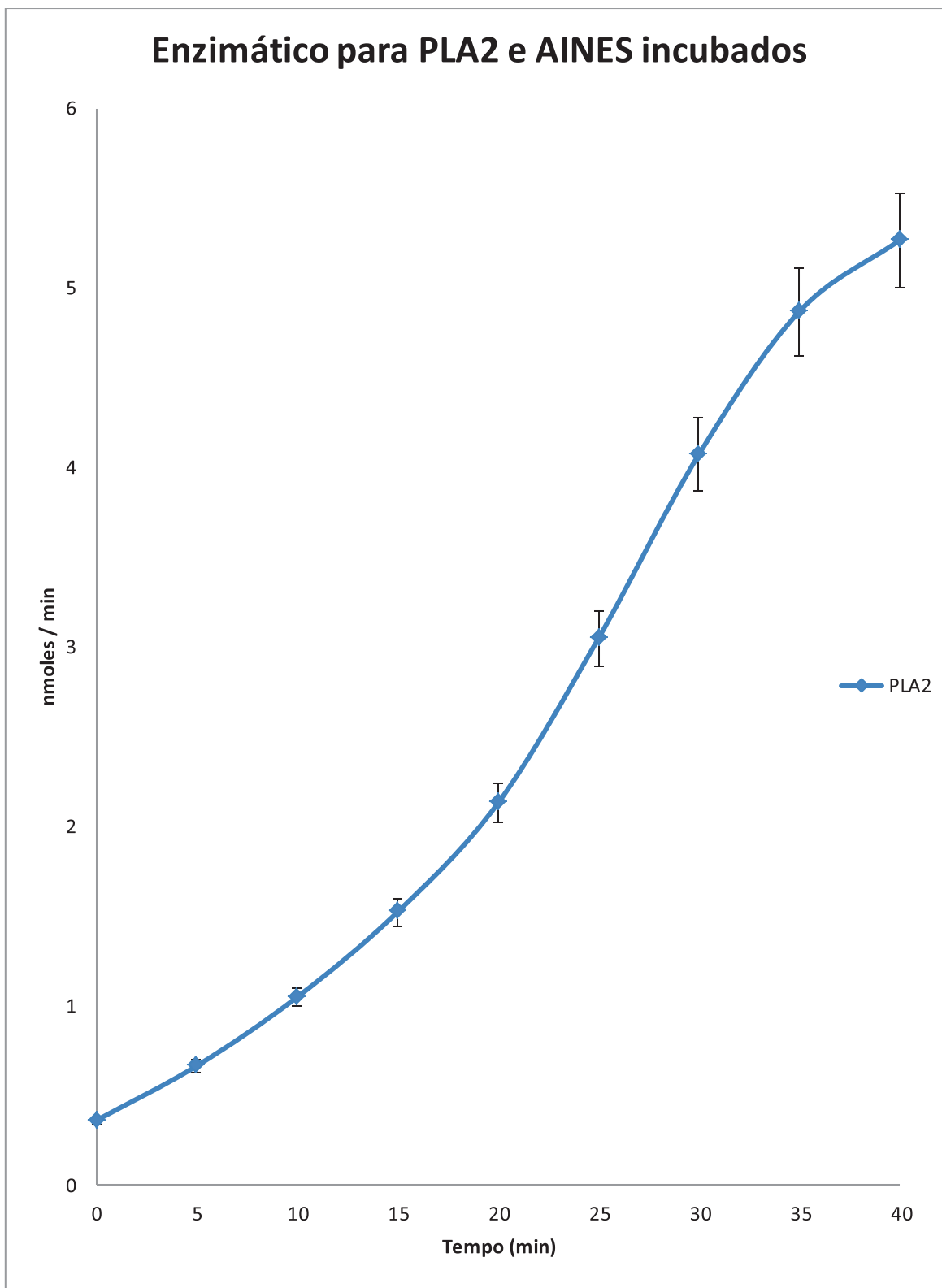


Figura 6.12: Determinação da atividade cinética da PLA₂ F17 sob influência das amostras de 1 a 8 foi realizado para a PLA₂ incubada com cada amostra. Para todas as oito condições, pode-se observar resultado semelhante ao demonstrado acima.

7.6 ATIVIDADE MIOTÓXICA

A avaliação do efeito dos anti-inflamatórios sobre a ação miotóxica da PLA₂, nas diferentes condições propostas, foi primeiramente avaliada pelo efeito individual de cada AINES e PLA₂. As demais condições avaliadas foram: PLA₂s incubadas com os AINES por 30 min, PLA₂ não incubada com os AINES e AINES injetados no peritônio + PLA₂ injetada no músculo. Para avaliação do efeito, foi utilizado o kit CK-NAC, o qual mede os níveis de creatina kinase presente no sangue.

Nesta primeira análise, foi observado um aumento na atividade miotóxica, pelo aumento da liberação e de creatina quinase (Figura 6.13), para a PLA₂, e, principalmente, para aos AINES 6, 7 e 8. Entretanto, os valores dos AINES aumentaram para as amostras 6 e 7 não incubadas com PLA₂, enquanto os demais valores permaneceram praticamente inalterados (Figura 6.14).

Para a análise realizada com os AINES injetados via intraperitoneal (Figura 6.15), os AINES 5 e 6 não foram capazes de realizar significativa diminuição na liberação de creatina quinase, ao passo que ocorreu diminuição nos valores de creatina quinase liberados para a PLA₂, combinada com a injeção intraperitoneal para os demais AINES, esta diminuição de aproximadamente 50% para as amostras 7 e 8, 66% para as amostras 3 e 4 e de 80% para a amostra 2 e 90% para a amostra 1. Esse resultado indicou que o efeito miotóxico induzido pela PLA₂ pôde ser parcialmente reduzido quando se utilizaram alguns dos anti-inflamatórios testados.

Miotóxico para PLA₂ e Amostras de AINS

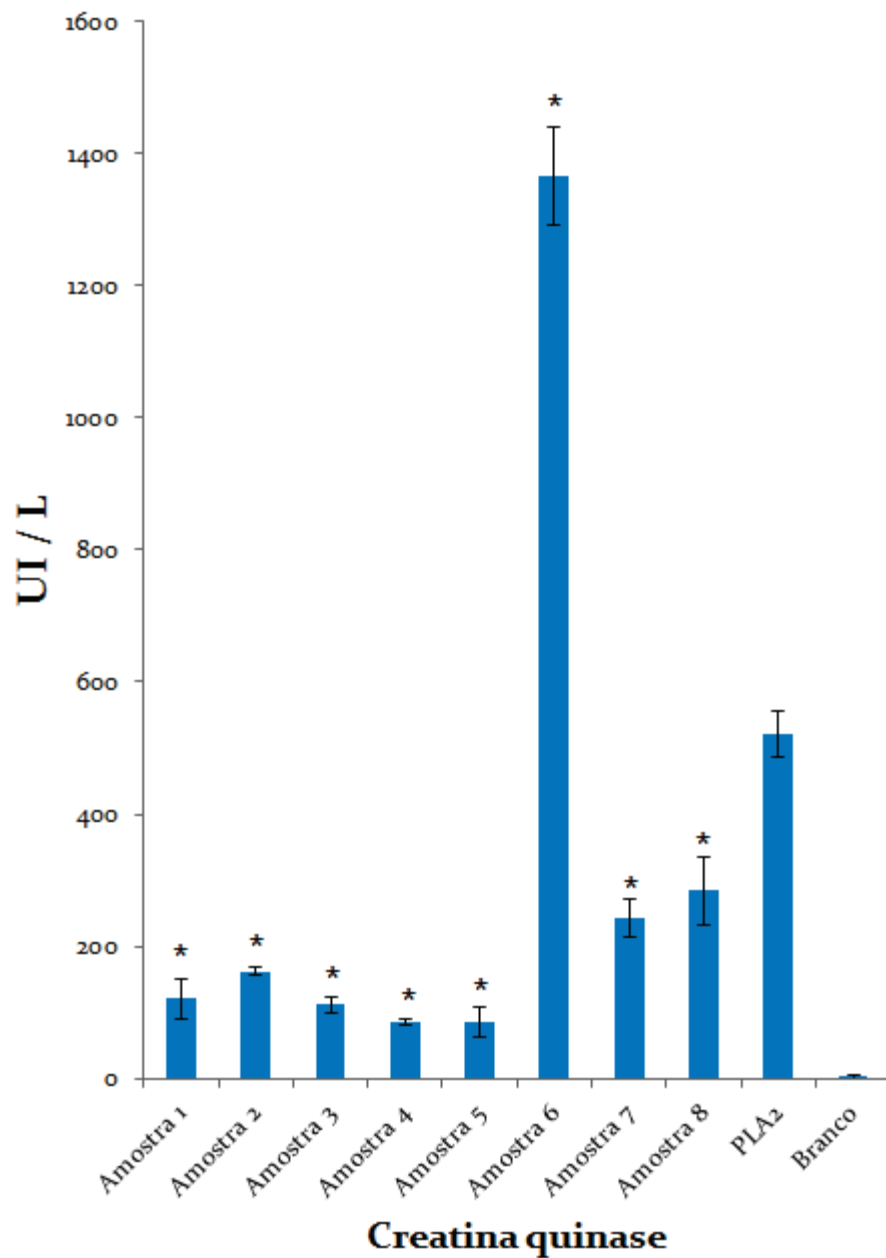


Figura 6.13 Atividade miotóxica da PLA₂ F17 de *B. leucurus* e amostras de AINES A PLA₂ nativa apresentou forte efeito miotóxico, sendo superada apenas pelo efeito miotóxico provocado pela amostra 6, todas as outras amostras de anti-inflamatórios, com exceção das amostras 7 e 8, apresentaram atividade miotóxica inferior a 50% da atividade apresentada pela PLA₂

Miotóxico para PLA₂ e AINS não incubados

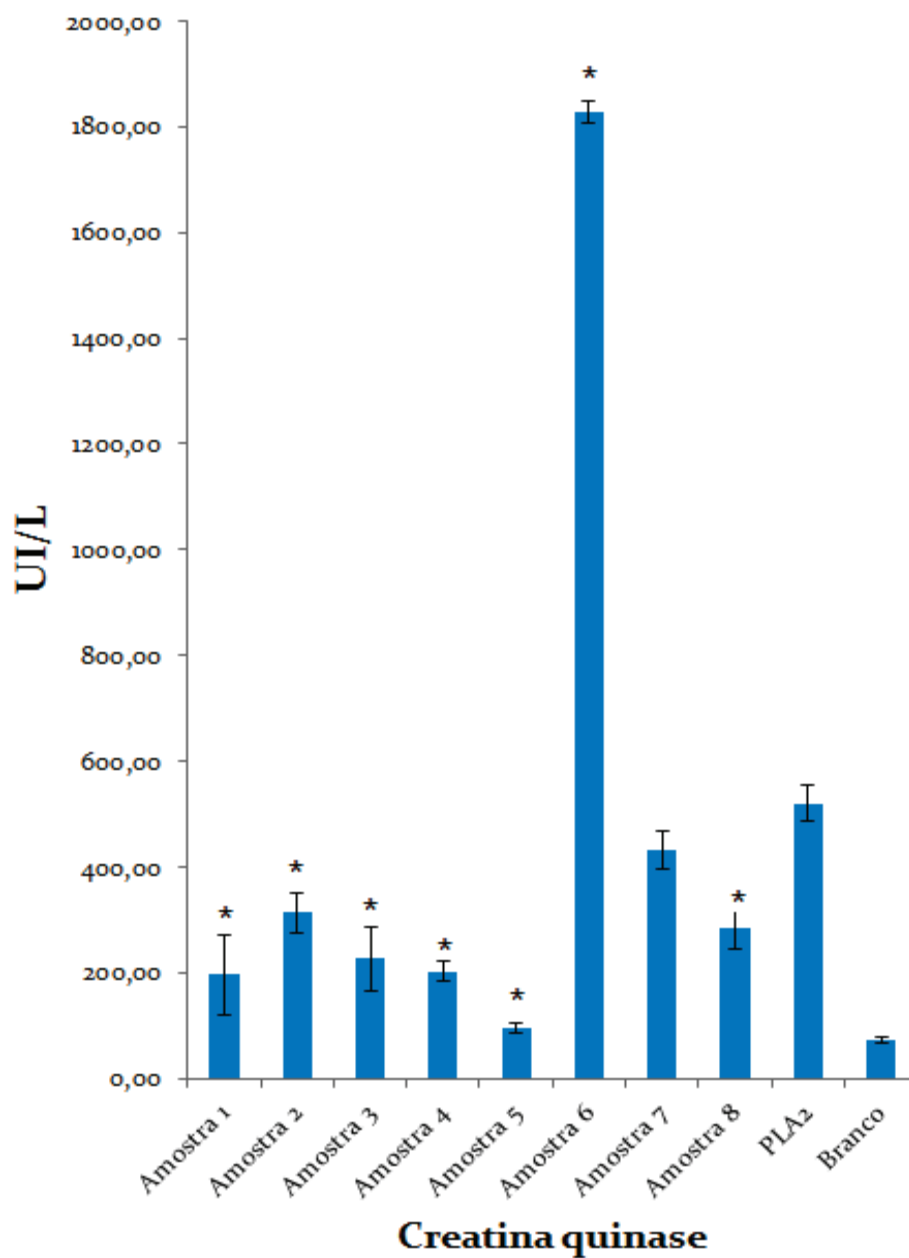


Figura 6.14 Atividade miotóxica da PLA₂ F17 de *B. leucurus* e amostras de AINES não incubadas. Com exceção das amostras 6 e 7, todas as demais amostras foram capazes de reduzir a atividade miotóxica da PLA₂ quando foram injetadas junto com a PLA₂.

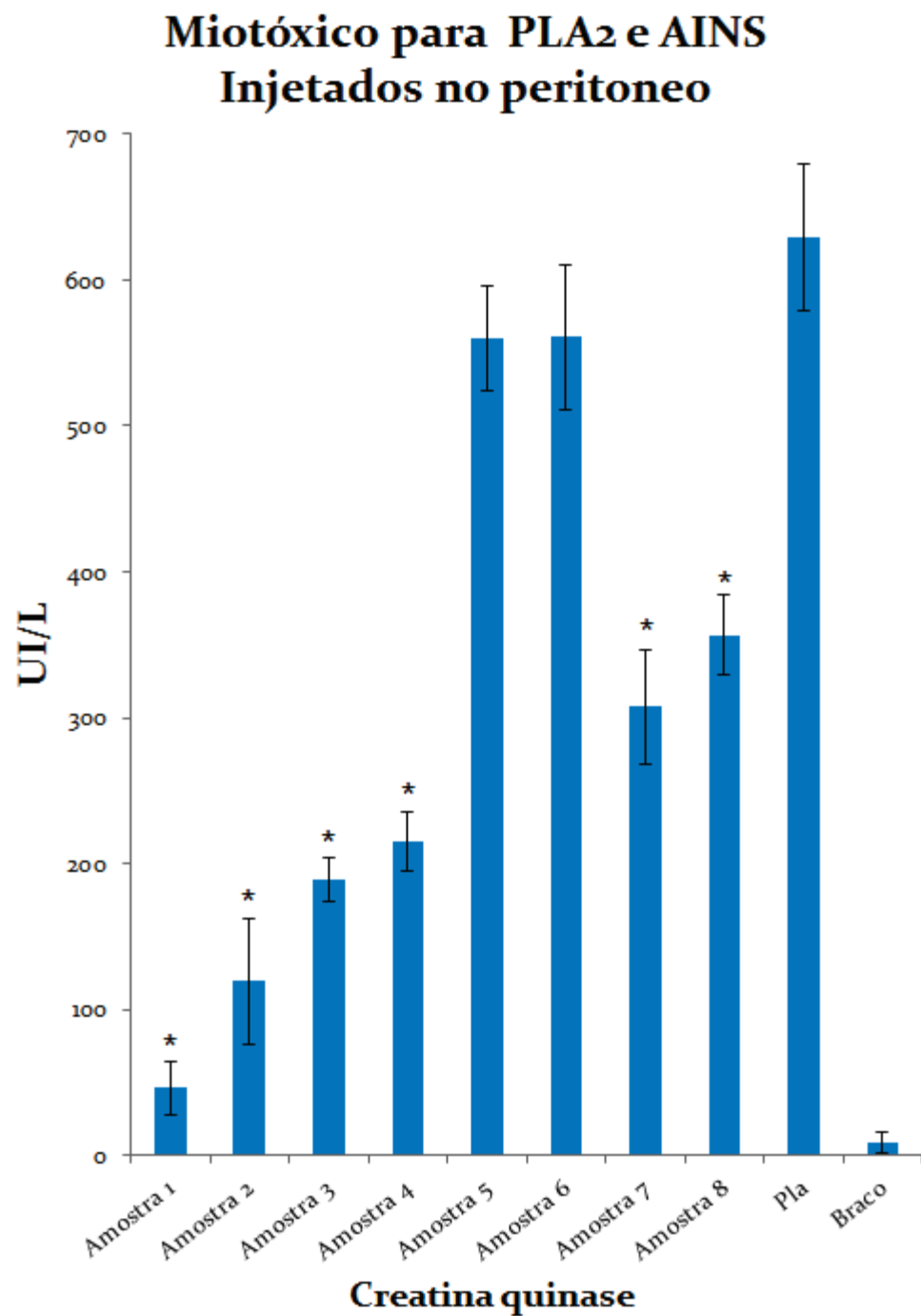


Figura 6.15 Avaliação da redução da atividade miotóxica, induzida por PLA₂s *B. leucurus*, quando os animais foram tratados com AINES injetados intraperitonealmente.

7.7 EDEMA DE PATA

A atividade pró-inflamatória da PLA₂ foi avaliada através de ensaio de formação de edema em camundongos, com diferentes condições de tratamento propostas. Primeiramente, foi analisado a formação de edema com a PLA₂ e AINES (figura 6.15) e PLA₂s não incubados com os AINES (figura 6.17) e PLA₂ injetados na pata e AINES injetados no peritônio (figura 6.18). Foi injetada na pata traseira direta de camundongos 25µL de cada amostra. Após adição da amostra de PLA₂s, foi possível observar um inchaço causado pela formação do edema.

Os animais, quando injetados com PLA₂, e depois tratados com AINES intraperitoneal, demonstraram estar incomodados. No entanto, quando o anti-inflamatório era co-injetado com PLA₂ foi observada uma aparente analgesia.

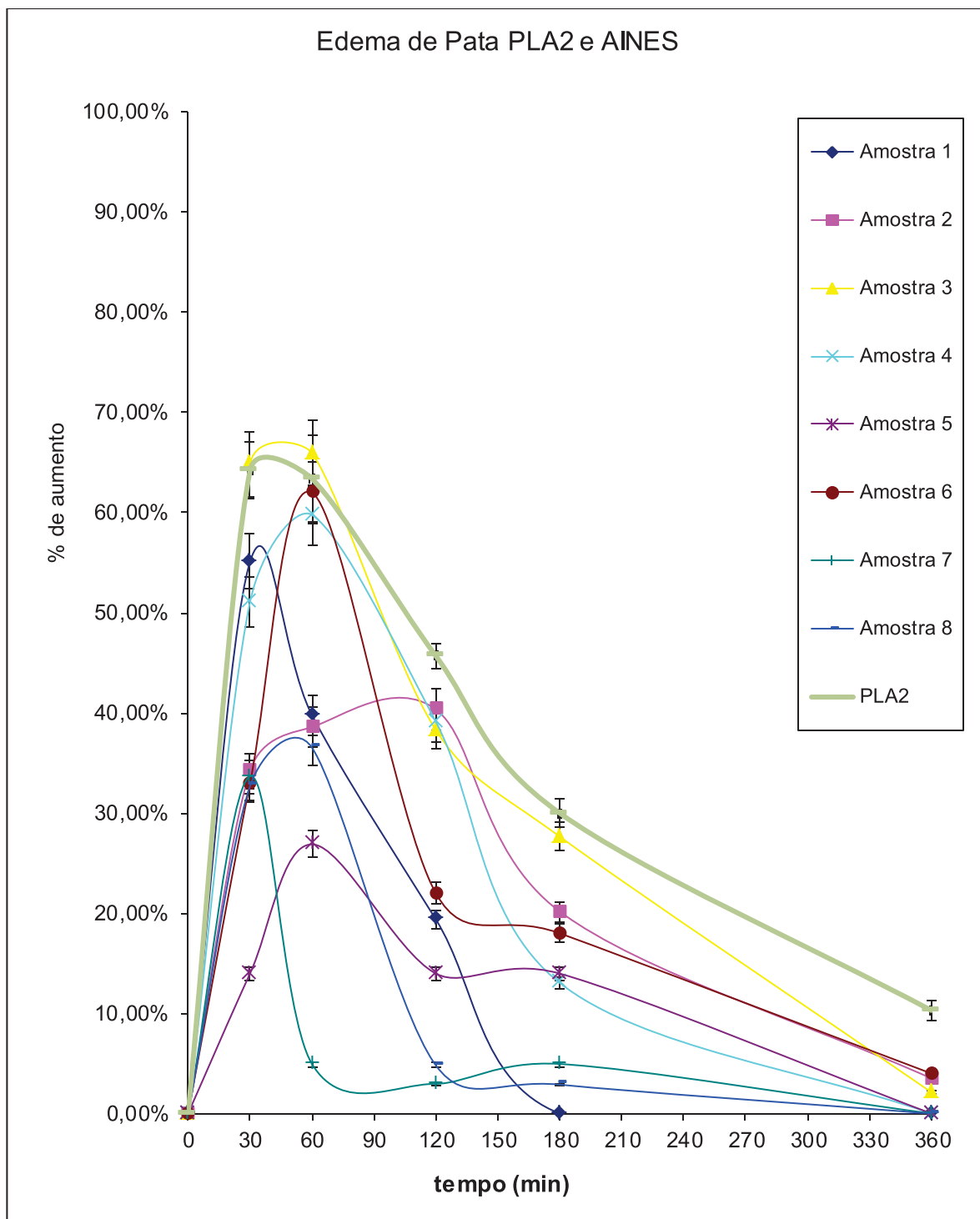


Figura 6.16. Amostras de PLA₂ e de AINES injetadas na pata traseira direita dos animais. A PLA₂ de *B. leucurus* apresentou intensa e duradoura atividade edematogênica. As amostras de AINES, embora tenham também produzido resposta de intensidade semelhante, não provocou resposta duradoura.

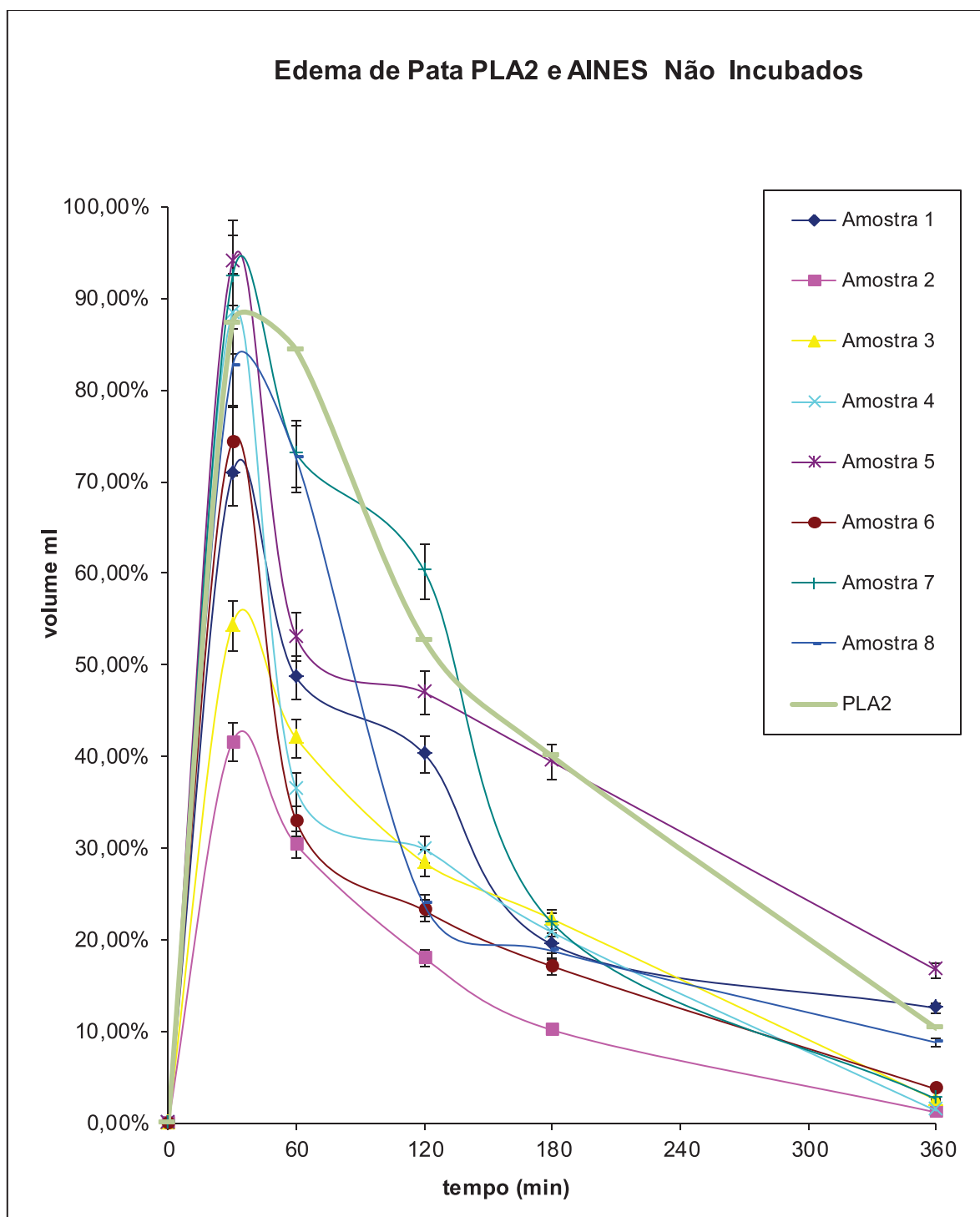


Figura 6.17 A PLA₂ e *B. leucurus*, quando injetada juntamente com as amostras de AINES, na pata traseira direita dos animais.

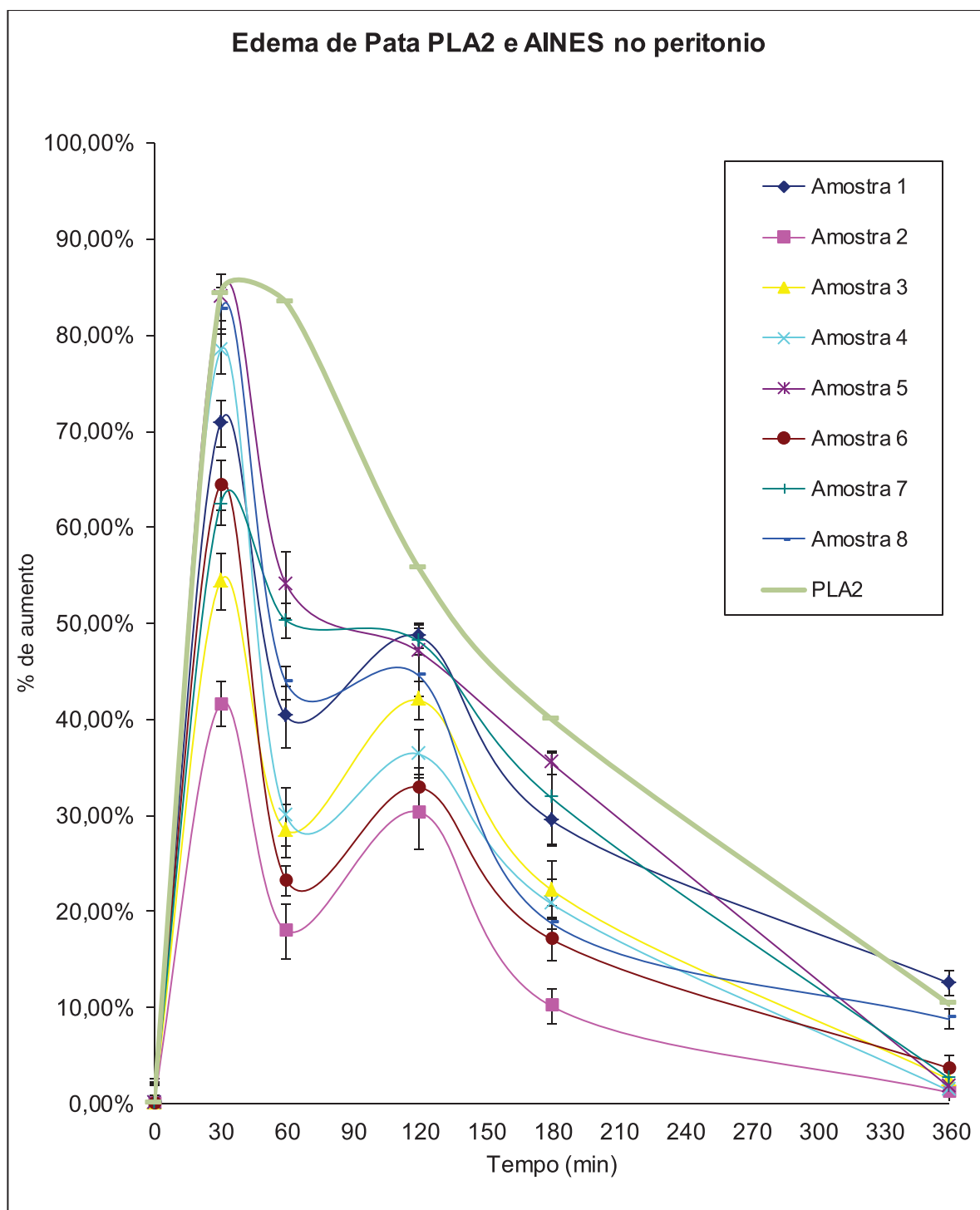


Figura 6.18. Edema de pata induzido por PLA₂ e tratado por injeção intraperitoneal de AINES.

7.8 ATIVIDADE HEMORRÁGICA

A avaliação da atividade hemorrágica (Figura 6.19) foi realizada pela comparação das medidas dos halos produzidos na pele dos animais pela fração F17 de PLA₂ pura, com a medida dos halos que também foram formados quando injetados os AINES, e com o halo formado quando se injeta o AINES no peritônio e a PLA₂ na pele. Observou-se que os melhores resultados foram obtidos para as amostras 3 e 6, quando o tratamento foi feito por injeção dos AINES no peritônio.

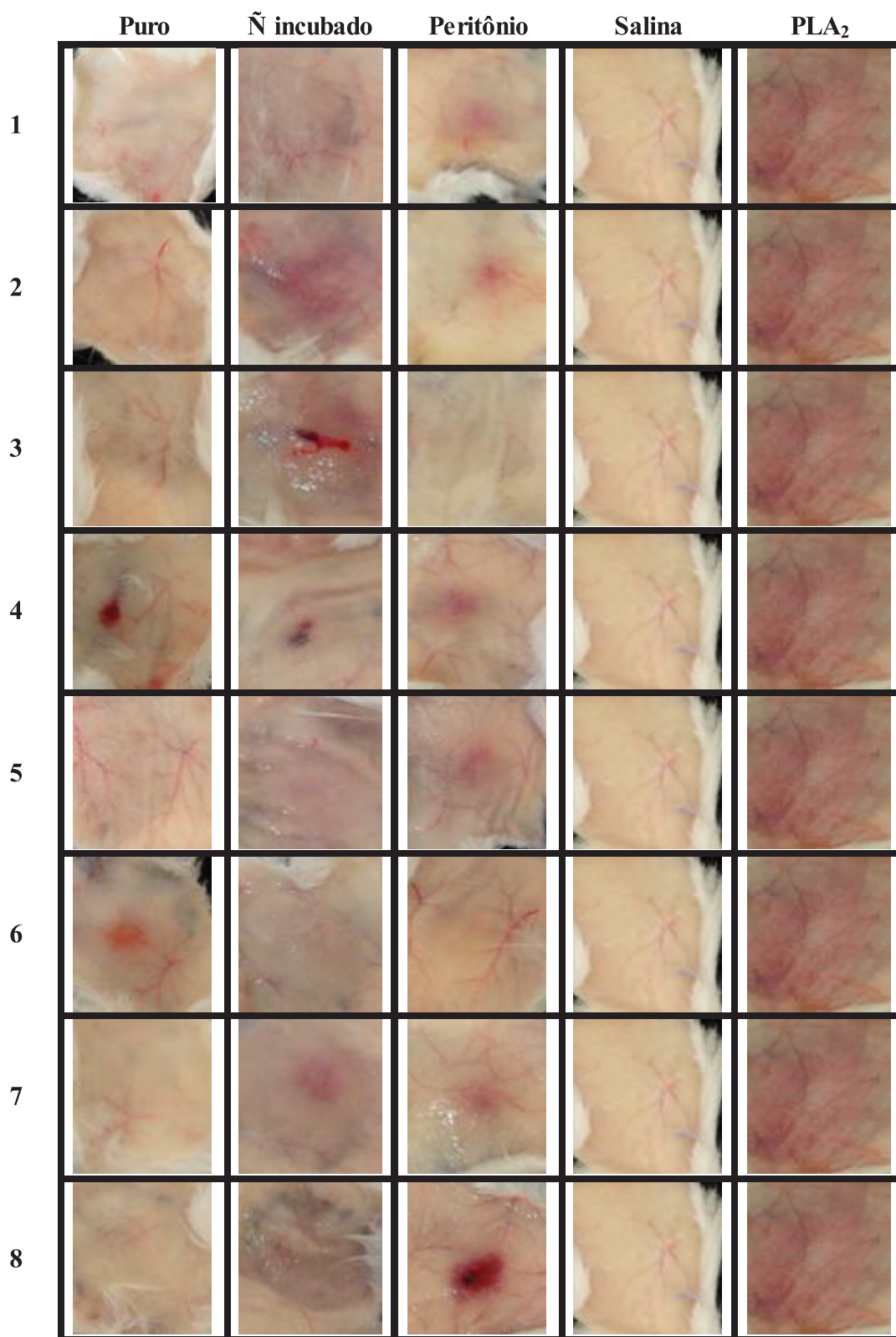


Figura 6.19 Avaliação da atividade Hemorrágica, determinada pela injeção de 25µL de cada uma das oito amostras nas diferentes condições testadas.

7.9 EDEMA DE PELE

Segundo as Figuras. 6.20, 6.21 e 6.22 os AINES, nas diferentes condições testadas, não foram capazes de inibir a atividade edematogénica da PLA₂ de *B. leucurus*. Observou-se que apenas a condição não incubada da amostra 8, e as amostras 6 e 7 injetadas no peritônio, reduziram o edema de pele formado pela PLA₂.

Edema de Pele para Amostras Puras

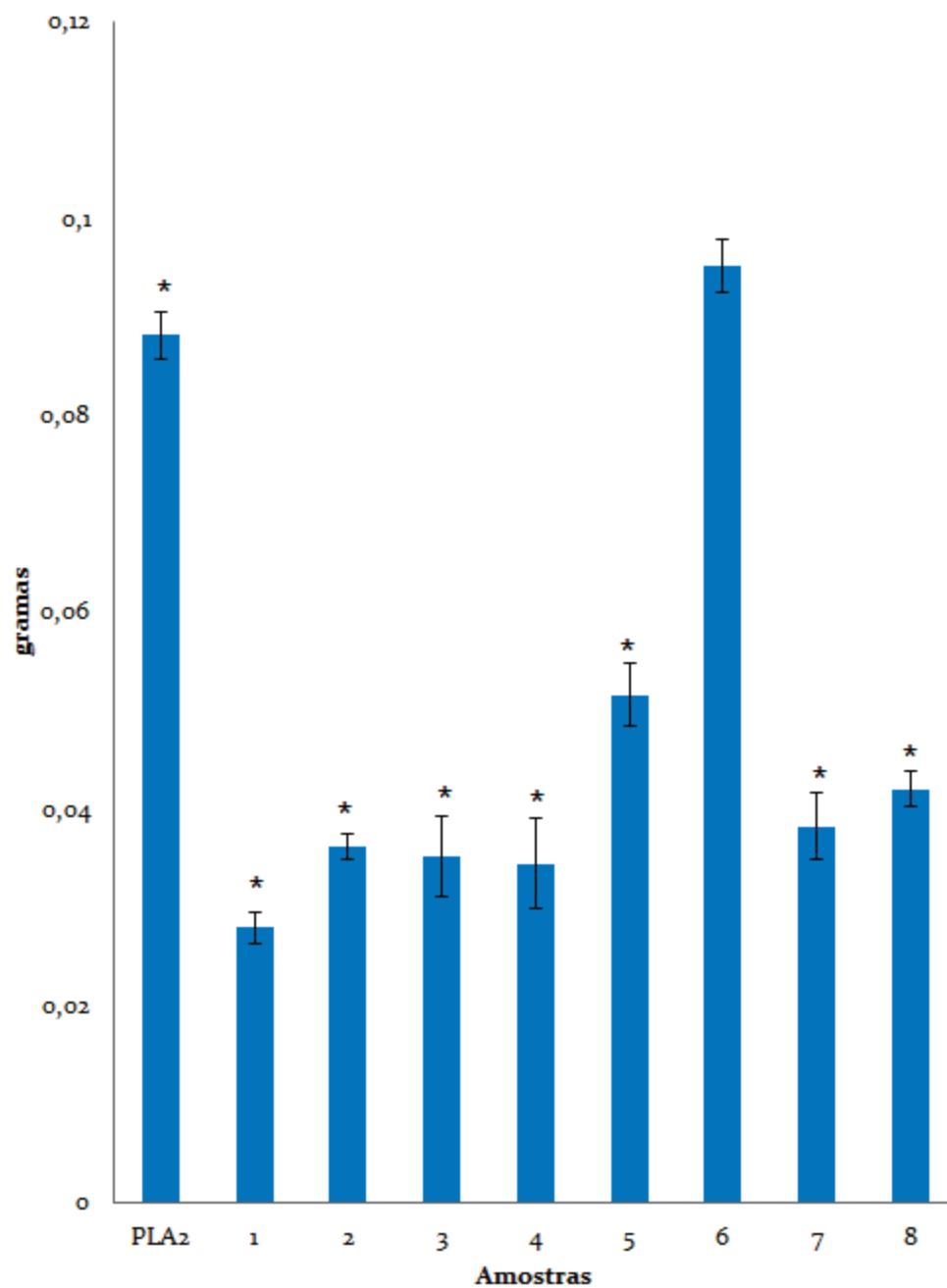


Figura 6.20 Efeito das amostras de AINES e PLA₂ puras no edema de pele induzido em camundongo.

Edema de Pele para Amostras não incubadas

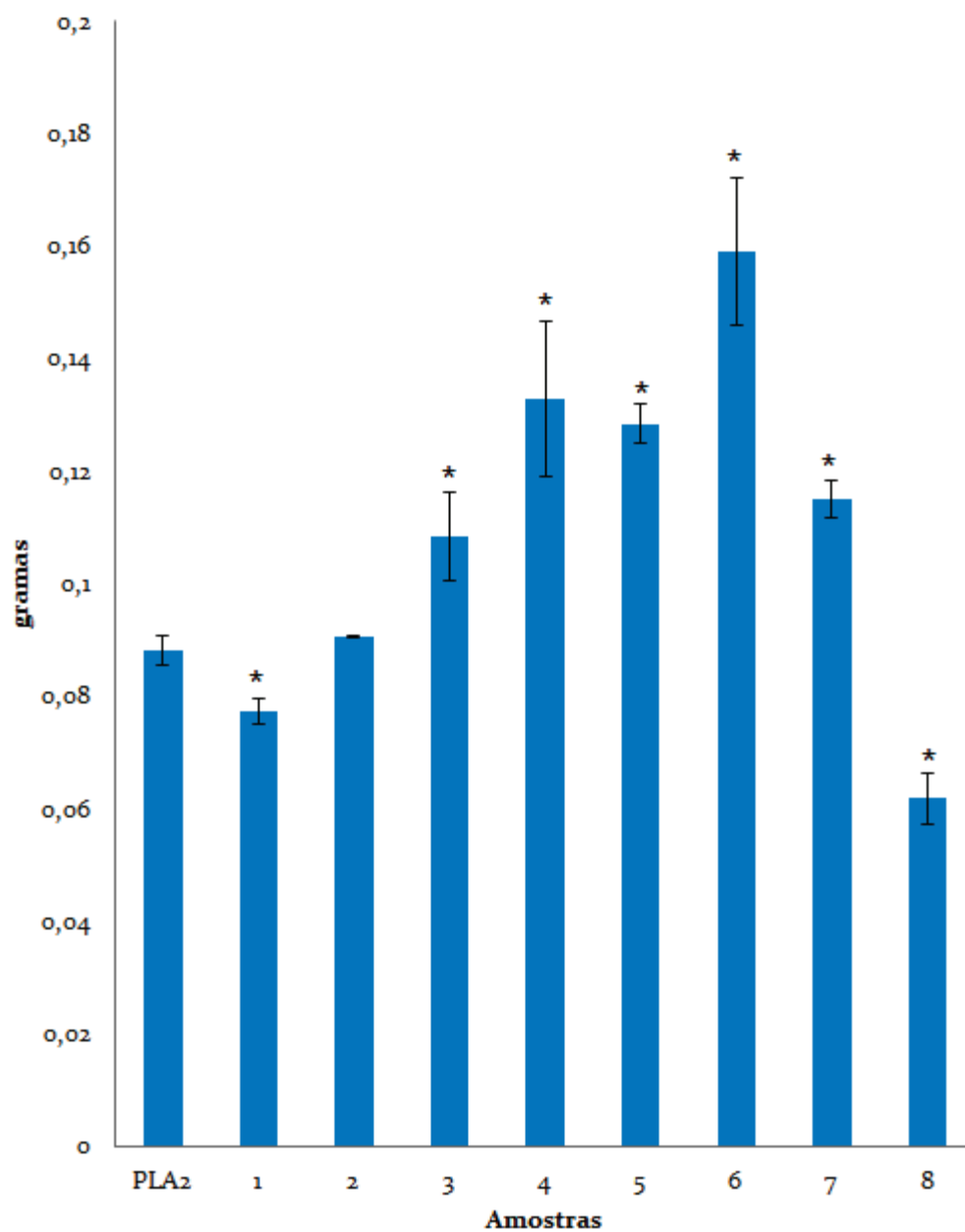


Figura 6.21 Efeito das amostras de AINES e PLA₂ na situação não incubada no edema de pele induzido em camundongo.

Edema de Pele para Amostras Peritonio

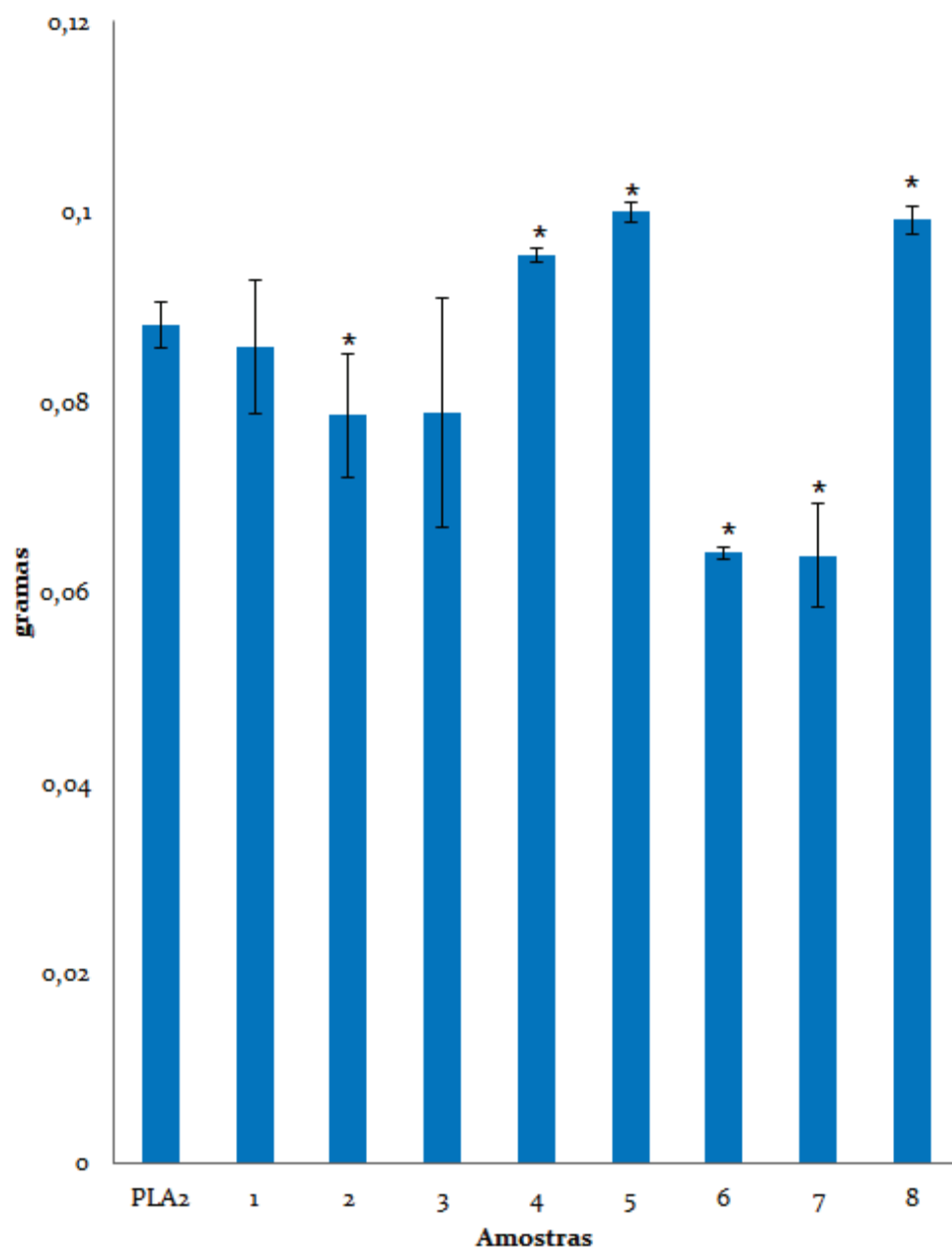


Figura 6.22 Efeito das amostras de AINES injetados no peritônio e PLA₂ injetados na pele, para demonstrar o edema de pele induzido em camundongo.

7.10 ATIVIDADE DE AGREGAÇÃO DE PLAQUETAS

Os experimentos de agregação demonstraram que o efeito da PLA2 F17 de *B. leucurus* não sofreu modificação quando o teste foi realizado na presença dos 2, 4 e 8. Entretanto, as amostras 1, 3, 5, 6 e 7 de AINES alteraram significativamente a atividade de agregação plaquetária da PLA2 de *B. leucurus*.

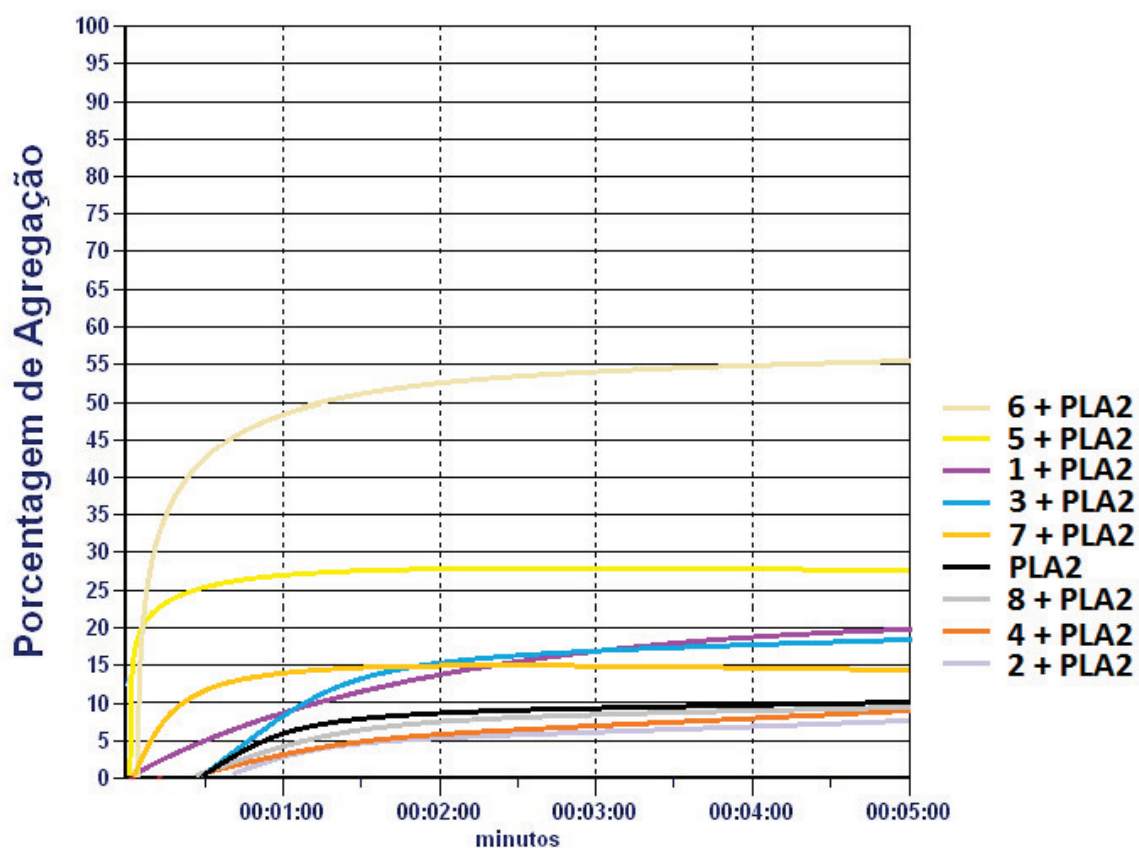


Figura 6.23: Efeito das amostras de AINES e PLA2 na atividade de agregação plaquetária.

8 DISCUSSÃO

As PLA₂ presentes em venenos de serpentes exercem uma grande variedade de efeitos farmacológicos, dentre eles, uma importante atividade edematogênica (Gutiérrez e Lomonte 2003). Por um longo tempo, acreditou-se que a hidrólise dos fosfolípidos de membrana celular era causada pelas PLA₂ através de seus efeitos biológicos, mas as tentativas de correlacionar esses efeitos com a atividade catalítica foram infrutíferas (Kini e Evans, 1989). O edema induzido pelos venenos se caracteriza por ser de aparecimento imediato, podendo alcançar seu pico em intervalo de 30 minutos (Cardoso et al., 2001). Estas substâncias podem induzir edema através da liberação do ácido araquidônico em consequência da degradação enzimática da membrana fosfolípídica, aumentando a biossíntese de eicosanóides.

Segundo Teixeira e colaboradores (2003), três tipos de PLA₂ estão envolvidos com a liberação de ácido araquidônico: tipo IV; PLA₂ citossólica e PLA₂ secretórias do tipo II e V. Uma vez liberado, o ácido araquidônico é convertido em intermediários instáveis (PGG₂ e PHG₂) pelas ciclooxigenases 1 e 2 (COX 1; COX 2) e então PHG₂ é convertido nas prostacilinas ativas PGD₂; PGE₂;PGF_{2α}; PGI₂ ou em tromboxanos A₂ (TXA₂) através da ação de síntases específicas. Prostaglandinas têm um importante papel na inflamação e na hiperalgesia. Embora elas pareçam não estar relacionadas diretamente com efeitos de permeabilidade vascular, a presença PGE₂ e PGI₂ aumentam a formação de edema e infiltração de leucócitos promovendo o fluxo sanguíneo na região inflamada (Teixeira et al., 2003).

Os lípidios hidroperóxidos resultantes do metabolismo do ácido araquidônico pelas enzimas lipoxigenases (5-, 12-, e 15-, lipoxigenases) também exercem função relevante como mediadores de inflamação, diferentemente da PGE₂ e PGI₂, os peptidoleucotrienos

(LTC₄; LTD₄ e LTE₄) apresentam grande efeitos na permeabilidade vascular (Teixeira et al., 2003).

Vários estudos vêm sendo feitos na busca de anti-inflamatórios capazes de diminuir os efeitos das PLA₂ de venenos de serpentes (Lindahl e Tagesson, 1998; Kim et al., 2001; Iglesias et al., 2005; Lättig et al., 2007; Toyama et al., 2009). Segundo esses modelos, algumas moléculas podem interagir com sítio enzimático da PLA₂ e alterar a atividade catalítica e algumas ações farmacológicas.

Na primeira fase deste trabalho, uma PLA₂ purificada do veneno de *Bothrops leucurus* foi submetida a tratamento químico com os AINES (pré-incubação). Após o tratamento, analisado por HPLC-UV de fase reversa (SCHESHOWITSCH et al. 2007, e Favoretto et al. 2010) não mostrou modificação nos perfis encontrados para a PLA₂ ou para os AINES. Todas as análises cromatográficas, realizadas para as amostras AINES incubadas com PLA₂ foram semelhantes às análises realizadas para as amostras de AINES não incubadas com PLA₂, resultado que demonstra não haver interação entre a PLA₂ purificada do veneno de *Bothrop leucurus* e os AINES selecionados para o estudo. Ao mesmo tempo, pudemos observar que o período de incubação de 30 min a 37 °C não alterou a estabilidade dos AINES ou da PLA₂, uma vez que não foi possível observar interação ou modificação da PLA₂, através de seu perfil cromatográfico por varredura de espectro.

As amostras de AINES não provocaram alteração no substrato 4N3OBA, utilizado para verificar a atividade cinética da PLA₂, quando comparados com a atividade alostérica clássica visualizada para a PLA₂. O tratamento com as amostras de AINES não demonstrou resultado distinto ao resultado obtido quando o teste foi realizado com a PLA₂ pura, uma vez que já foi observado que não existe ligação ou modificação da PLA₂ provocada pelos

AINES. Entretanto, observou-se mudança na atividade cinética da PLA₂, quando as amostras de AINES estavam presentes nos testes. Isto demonstrou que pode haver interferência de alguns AINES sobre a atividade enzimática da PLA₂. A amostra 6, não incubada com PLA₂, foi a única amostra que não provocou aumento na atividade enzimática aparente para a PLA₂.(Figura 6.16)

Apesar de a maioria dos AINES ter induzido aumento na atividade enzimática, observou-se que houve diminuição no edema induzido pela PLA₂ em relação ao edema induzido para PLA₂ + AINES (quando PLA₂ e AINES foram coinjectados, e para quando a PLA₂ foi injetada na pata e AINES injetados no peritônio). Entretanto, nos dois últimos casos, o principal resultado observado foi que os animais que receberam os AINES no mesmo local de injeção da PLA₂ apresentaram ausência de dor, tendo os anti-inflamatórios apresentado efeito analgésico, enquanto que, quando os AINES foram injetados no peritônio, ocorreu rápida diminuição no edema, mas sem ausência de dor, para todas as amostras AINES testadas. Resultados semelhantes já foram observados por Toyama e colaboradores (2009) após tratamento da PLA₂ da *Crotalus durissus collilineatus* com 7-hidroxycumarina, sugerindo a existência de um diferente sítio possivelmente modulatório, não relacionado com a atividade catalítica e responsável por ações farmacológicas.

A miotoxidade induzida pelo evenenamento por serpentes teve como principal agente indutor a PLA₂. O mecanismo para esse efeito não foi único e envolveu inúmeros fatores, tais como dependência ou não de cálcio e interação das moléculas de PLA₂ com células musculares (Gutierrez e Ownby 2003). Alguns AINES foram como a PLA₂ responsáveis por promover efeito miotóxico, com intensidade similar ou superior ao efeito produzido pela PLA₂, casos das amostras 6, 7, e 8. Entretanto, embora o efeito produzido pela PLA₂ injetada com os AINES fosse similar ao resultado obtido para as amostras puras, indicando

que alguns AINES foram capazes de inibir o efeito miotóxico da PLA₂, quando as amostras de AINES foram injetadas no peritônio dos animais, apenas as amostras 5 e 6 não reduziram o efeito miotóxico produzido pela PLA₂. Após pré-incubação com os anti-inflamatórios não ocorreu mudança na atividade da PLA₂ uma vez que já foi comprovado que os anti-inflamatórios não se ligam as PLA₂, sendo retiradas da amostra quando esta foi submetida a cromatografia de fase reversa

Os resultados do teste para atividade hemorrágica de PLA₂ demonstraram que as amostras 3 e 6 foram capazes de reduzir o efeito hemorrágico produzido pela PLA₂, somente quando injetados no peritônio, as demais condições testadas não demonstraram ser eficientes para diminuir a atividade hemorrágica provocada pela PLA₂. Estes resultados apresentados para a atividade hemorrágica foram semelhantes aos resultados encontrados para o edema de pele, que neste caso não apresentou melhora do quadro edematogênico para nenhuma das amostras, em nenhuma das condições testadas, pois, mesmo os resultados apresentando redução do edema para as amostras 1 e 8, quando coinjetadas, e as amostras 2 (AAS), 6 (diclofenaco de sódio) e 7 (indometacina) injetadas no peritônio, neste caso, as medidas que demonstraram menor intensidade do edema para determinados AINES, na verdade, eram ocasionados pela perda tecidual e não pela diminuição do edema.

Os resultados sugeriram que, apesar da influência na atividade enzimática, o sítio biológico da proteína também foi modificado, mesmo estando em região distinta do sítio catalítico (Kini e Evans, 1989). No entanto, pudemos observar que os efeitos edematogênico e miotóxico da PLA₂ de *B. Leucurus* não estão de acordo com os resultados de sua atividade enzimática. Existem controvérsias com relação à atividade catalítica dos venenos estarem associada a eventos como a mionecrose e atividades hidrolíticas do veneno de serpentes. Em relação a tal fato, os resultados obtidos sugeriram que a

miotoxicidade induzida por PLA₂ de *B. lucurus* não foi causada pela atividade enzimática da PLA₂, pois esse efeito é similar ao encontrado pela heparina, um carboidrato complexo, incubada com PLA₂ de Cdcogli (Toyama et al, 2005).

9 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados sugeriram que o processo de pré-incubação da PLA₂ com os AINES não resultaram em ligação entre a PLA₂ e os AINES testados. Sugerem também que os AINES, com exceção da amostra 6 (Diclofenaco de sódio), aumentaram a afinidade da enzima pelo substrato, aumentando sua atividade enzimática; a atividade enzimática da PLA₂ foi diminuída para a amostra 6 não incubada com PLA₂.

O efeito miotóxico da PLA₂ foi diminuído para as amostras 1(Piroxicam), 2 (AAS), 3 (paracetamol) , 4 (Dipirona sódica), 7 (Indometacina) e 8 (Nimesulida), enquanto que as amostras 5 (Ibuprofeno) e 6 (Diclofenaco de sódio) não foram capazes de diminuir o efeito miotóxico produzido pela PLA₂. Para as amostras não incubadas.

O efeitos edematogênicos da PLA₂ foram diminuídos, por todos os AINES testados, sendo as amostras 1(Piroxicam), 5 (Ibuprofeno), 7 (Indometacina) e 8 (Nimesulida) as menos eficientes em reduzir o edema formado pela PLA₂. Entretanto, todos demonstraram a necessidade de se administrar mais de uma dose para reduzir o tempo final do edema.

O efeito hemorrágico demonstrou que, com exceção das amostras 3 (paracetamol) e 6 (Diclofenaco de sódio), as demais amostras, 1(Piroxicam), 2 (AAS), 4 (Dipirona sódica), 5 (Ibuprofeno), 7 (Indometacina) e 8 (Nimesulida), não foram capazes de reduzir o efeito hemorrágico produzido pela PLA₂.

O efeito edematogênico da PLA₂ foi reduzido, apenas pelas amostras 1(Piroxicam), (piroxicam) e 8 (nimesulida) no edema de pele, quando os AINES foram co-injetados com

PLA₂, quando ao AINS foram injetados no peritônio, apenas as amostras 2 (AAS), 6 (diclofenaco de sódio) e 7 (indometacina) foram capazes de reduzir o edema.

Nenhum dos AINES foram capazes de reduzir significativamente a atividade da PLA₂ sobre a agregação plaquetária, entretanto, as amostras 1(Piroxicam), 3 (paracetamol), 5 (Ibuprofeno), 6 (Diclofenaco de sódio) e 7 (Indometacina), aumentaram significativamente a atividade de agregação plaquetária em presença da PLA₂

Os anti-inflamatórios não esteroides com maior potencial inibitório para PLA₂ nas metodologias avaliadas são: 2 (AAS), 1(Piroxicam), 4 (Dipirona sódica), 3 (paracetamol), 8 (Nimesulida), 5 (Ibuprofeno), 7 (Indometacina) e 6 (diclofenaco de sódio), na sequência de maior para menor capacidade inibitória

Os AINES não provocam mudanças na estrutura da PLA₂ e não foram capazes de se ligar a esta proteína. Entretanto, foram capazes de inibir alguns dos efeitos biológicos provocados pela PLA₂ secretório do veneno de serpentes. Essa inibição não se deveu à inibição direta dos efeitos da PLA₂, mas sim à inibição dos intermediários das vias iniciadas pela PLA₂

10 BIBLIOGRAFIA

Agranoff D, Monahan IM, Mangan JA, Butcher PD, Krishna S. (1999) *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the Nramp family. J Exp Med. 6;190 (5):717-24.

Bidgood MJ, Jamal OS, Cunningham AM, Brooks PM, Scott KF. (2000) Type IIA secretory phospholipase A₂ up-regulates cyclooxygenase-2 and amplifies cytokine-mediated prostaglandin production in human rheumatoid synoviocytes.J Immunol. 1;165(5):2790-7.

Bonta, I.L., Adolfs, M.J. and Parnham, M.J. (1979). Distribution and further studies on the activity of prostaglandin E in chronic granulomatous inflammation. *Agents Actions Suppl.* (6):121-32.

Brain, S., Lewis, G.P. and Whittle, B.J. (1977). Actions of phospholipase-A on mast-cell histamine release and paw oedema in the rat [proceedings. *Br. J. Pharmacol.* 59(3):440P-441P.

Brazil, V., (1911). *A Defesa Contra o Ophidismo*. São Paulo: Pocaí & Weiss.

Bülbring, (1946) Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br J Pharmacol* 1(1): 38–61

Chandra, V., Jasti, J., Kaur, P., Betzel, C., Srinivasan, A., Singh, T.P., (2002). First structural evidence of a specific inhibition of phospholipase A₂ by α -Tocopherol (Vitamin E) and its implication in inflammation: crystal structure of the complex formed between phospholipase A₂ and α -Tocopherol at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 320, 215–222.

Cirino, G. (1989). Multiple controls in inflammation. Extracellular and intracellular phospholipase A₂, inducible and constitutive cyclooxygenase, and inducible nitric oxide synthase. *Biochem. Pharmacol.* 55(2):105-11.

Damerau, B., Lege, L., Oldigs, H.D. and Vogt, W. (1975). Histamine release, formation of prostaglandin-like activity (SRS-C) and mast cell degranulation by the direct lytic factor (DLF) and phospholipase A of cobra venom. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 287(2):141-56.

Dennis, E.A. (1994). Diversity Of Group Types, Regulation and function of Phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 269 (18): 13057-13060.

Dennis, E.A., (1997). The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci.*;22(1):1-2.

Favoretto, L.B., Souza, J.M.O., Bonfilio, R., Azevedo, R.C. P., Araújo, M. B. et al (2010) Validação de método espectrofotométrico na região do uv para quantificação de famotidina em cápsulas Quim. Nova, 33, (7), 1585-1589.

Fenton JW 2nd, Shen GX, Minnear FL, Brezniak DV, Jeske WP, Walenga JM, Bognacki JJ, Ofosu FA, Hassouna HI. (2000) Statin drugs and dietary isoprenoids as antithrombotic agents. Hematol Oncol Clin North Am. Apr;14(2):483-90, xi. Review.

Frolich, J.C. (1997). The classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. Trends Pharmacol Sci. 18, 30-34.

Fuentes, L., Hernández, M., Nieto, M.L. and Crespo, S. (2002). Biological effects of group IIA secreted phospholipase A2. FEBS Letters 531, 7-11.

Granger DN, Kubes P. (1994) The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. J Leukoc Biol. May;55(5):662-75. Review.

Harvey AL, Bradley KN, Cochran SA, Rowan EG, Pratt JA, Quillfeldt JA, Jerusalinsky DA. (1998) What can toxins tell us for drug discovery? Toxicon. Nov;36(11):1635-40.

Holzer, M. and Mackessy, S.P. (1996). An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. Toxicon 34 (10) 1149-1155

Horrocks LA, Farooqui AA. (2004) Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. Apr;70(4):361-72. Review.

Iglesias CV, Aparicio R, Rodrigues-Simioni L, Camargo EA, Antunes E, Marangoni S, de Oliveira Toyama D, Beriam LO, Monteiro HS, Toyama MH. (2005) Effects of morin on snake venom phospholipase A2 (PLA₂). Toxicon. 1;46(7):751-8.

Jiménez - Porras, J.M. (1973) Reptile toxins. in: Biolog. Data Book, 2^a ed, vol. II P. 697. Fed. of American Society for experimental Biology (FASEB), BETESDA, MD., USA.

Kudo, I., Murakami, M., (2002). Phospholipase A₂ enzymes. Rostaglandins Other Lipid Mediat., 68-69: 3-58.

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

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

Moreno, J.J., Ferrer, X., Ortega, E., Carganico, G. (1992). PLA₂-induced oedema in rat skin and histamine release in rat mast cells. Evidence for involvement of lysophospholipids in the mechanism of action. Agents Actions. 1992 Jul;36(3-4):258-63.

Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G., Inoue, K. and Kudo, I., (1997). Regulatory functions of phospholipase A₂. Crit Rev Immunol, 17(3-4):225-83.

Murakami, M. and Kudo, I., (2002). Phospholipase A₂. Biochem (Tokyo), 131(3):285-92.

Murakami, M., Yoshihara, K., Shimbara, S., Lambeau, G., Singer, A., Gelb, M.H., Sawada, M., Inagaki, N., Nagai, H. and Kudo, I. (2002). Arachidonate Release and Eicosanoid Generation by Group IIE Phospholipase A₂. Biochemical and Biophysical Research Communications, 689–696.

Nevalainen TJ, Haapamaki MM, Gronroos JM. (2000) Roles of secretory phospholipases A(2) in inflammatory diseases and trauma. Biochim Biophys Acta. Oct 31;1488(1-2):83-90. Review.

Oka S, Arita H. (1991) Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A2 in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of the gene expression. J Biol Chem. May 25;266(15):9956-60.

Pruzanski, W., Bogoch, E., Stefanski, E., Wolch, M., Vadas, P. (1991). Enzymatic activity and distribution of phospholipase A2 in human cartilage, Life Sci. 48, 2457-2462.

Queiroz LS, Santo Neto H, Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J. (1984) Muscle necrosis and regeneration after envenomation by Bothrops jararacussu snake venom. Toxicon. 1984;22(3):339-46.

Radomski M, Moncada S. (1983) An improved method for washing of human Platelets with prostacyclin. Thromb Res. May 15;30(4):383-9.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Agentes antiinflamatórios e imunossupressores. In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. Cap. 13, p. 189-204.

Rodrigues-Simioni L, Borgese N, Ceccarelli B. (1983) The effects of Bothrops jararacussu venom and its components on frog nerve-muscle preparation. Neuroscience. 1983 Oct;10(2):475-89.

Rothchild A.M., Rothchild Z. (1979) Liberation of pharmacologically active substances by snake venom. In: LEE CY Ed. Snake Venoms. Berlin: Springer-Verlag.; 541.

Schaloske RH, Dennis EA. (2006) The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. Biochim Biophys Acta. Nov;1761(11):1246-59 2006 Aug 3. Review.

Scheshowitsch et al. (2007) Avaliação da Qualidade e Perfil de Dissolução de Capsulas Manipuladas de Piroxicam Lat. Am. J. Pharm. 26 (5): 645-51

Shah N.G. et al. 2010 Prostaglandin E2 potentiates heat shock-induced heat shock protein 72 expression in A549 cells. Prostaglandins & Other Lipid Mediators 93, (1-2) 1-7

Silva M.G, Oliveira F. S, QUINTANS-JÚNIOR L. J, OLIVEIRA T. M.L. e DINIZ M. F.F.M.. (2005) Investigação do Efeito Analgésico Central e Antiinflamatório de *Conocliniopsis prasiifolia* (DC) R.M. King & H. Robinson em Roedores *Acta Farm. Bonaerense* 24 (4): 533-7

Silva, P. Farmacologia Editora Guanabara Koogan 7ª edição, Rio de Janeiro, 2006

Singh, G., Jasti, J., Saravanan, K., Sharma, S., Kaur, P., Srinivasan, A. and Singh, T.P. (2005). Crystal structure of the complex formed between a group I phospholipase A2 and a naturally occurring fatty acid at 2.7 Å resolution. *Protein Sci.* 14(2):395-400

Singh, N., Jabeen, T., Somvanshi, R.K., Sharma, S., Dey, S. and Singh, T.P. (2004). Phospholipase A2 as a target protein for nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): crystal structure of the complex formed between phospholipase A2 and oxyphenbutazone at 1.6 Å resolution. *Biochemistry.* 43(46):14577-14583.

Singh, R.K., Ethayathulla, A.S., Jabeen, T., Sharma, S., Kaur, P. and Singh, T.P. (2005). Aspirin induces its anti-inflammatory effects through its specific binding to phospholipase A2: crystal structure of the complex formed between phospholipase A2 and aspirin at 1.9 Å resolution. *J. Drug Target.* 13(2):113-119.

Siqueira Jr. J.F. Inflamação aguda: Resposta Vascular e celular. In: Siqueira Jr, J.F.; Dantas, C.J.S. (2000) Mecanismos celulares e Moleculares da Inflamação. Rio de Janeiro: Medsi,

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

Srinivasan P, Vadhanam MV, Arif JM, Gupta RC. (2002) A rapid screening assay for antioxidant potential of natural and synthetic agents in vitro. *Int J Oncol.* May;20(5):983-6.

Vadas, P., Pruzanski, W., Kim, J. and Fornasier, V. (1989). The pro inflammatory effect of intra-articular injection of soluble human and venom phospholipase A₂. Am. J. Pathol. 134, 807-811.

Valentin, E. and Lambeau, G., (2000). Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. Biochimica et Biophysica Acta., 1488, 59-70.

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

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

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.

Wang, J.P. and Teng, C.M. (1990). Rat paw oedema and mast cell degranulation caused by two phospholipase A₂ enzymes isolated from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. J. Pharm. Pharmacol. 42(12):846-850.

Wynne, H.A. e Campbell, M. (1994). Pharmacoeconomics of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS). Pharmaco Economics 3: 107-123.

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

11 ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 3.1. a) Estrutura terciária da PLA ₂ de <i>Bothrops pirajai</i> , destacando-se a localização das estruturas secundárias desta molécula. B) Detalhes do sítio de ligação do cálcio e sua coordenação com o loop de ligação do cálcio e com a His 48 (Rigden et al., 2003). | 7 |
| Figura 3.2. Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para a PLA ₂ . (Verheij et al, 1980). a) Estrutura terciária da PLA ₂ , destacando-se o loop ligante ao Cálcio. b) Estágios do mecanismo de catálise: ataque base mediado sobre o substrato, formação e colapso do intermediário tetraédrico, liberação dos produtos. | 8 |
| Figura 3.3. Estrutura química dos glicerofosfolipídios de membranas celulares. Na posição sn-1 é geralmente encontrado um resíduo de ácido graxo saturado, como ácido palmítico ou esteáricos, e na posição sn-2 um resíduo de ácido graxo insaturado, como ácido oléico, linolênico ou araquidônico. O grupo fosfato é ligado a um átomo de hidrogênio – H (ácido fosfatídico) ou a uma base, como a colina ou etanolamina. | 12 |
| Figura 3.4. Esquema mostrando o mecanismo de ação pró-inflamatório das PLA ₂ baseado nos trabalhos descritos por Valentin et al., (1999), Six e Denni, (2000), Murakami e Kudo, 2002 e Fuentes et al., (2002). | 13 |
| Tabela 3.1 alguns dos anti-inflamatórios não esteroides | 19 |
| Tabela 3.2 os anti-inflamatórios não esteroides utilizados no trabalho. | 20 |
| Tabela 3.3: Classificação das Ciclooxygenases. Fonte: Silva, P. Farmacologia. (2004) | 21 |
| Figura 3.5. Atividade da PLA ₂ citosólica e os produtos da degradação dos fosfolipídios de membrana. O Lisofofosfolipídio (Liso-PAF) é precursor do Fator de ativação plaquetária. O Ácido araquidônico sofre ação das Lipooxygenases (5-LO) e das Ciclooxygenases 1 e 2 (COX1 e COX2) produzindo Leucotrienos (LTA ₄ , LTB ₄ , LTC ₄), Prostaglandinas (PGG ₂ , PGH ₂ , PGI ₂ , PGD ₂ , PGE ₂ , PGF ₂ α) e Tromboxanos (TXA ₂). | 22 |
| Tabela 3.4. Características de um grupo maior de Fosfolipases A ₂ (PLA ₂). | 25 |
| Figura 5.2 <i>Bothrops leucurus</i> | 29 |
| Figura 6.1: Perfil cromatográfico do fracionamento do veneno total de <i>Bothrops leucurus</i> através de cromatografia de Exclusão Molecular TSK Gel G3000SW | 38 |
| Figura 6.2: Perfil cromatográficos do fracionamento do veneno total de <i>Bothrops leucurus</i> através de cromatografia de troca iônica em coluna protien pack SP- 5pw. | 39 |
| Figura 6.3. Perfil cromatográficos do fracionamento do veneno total de <i>Bothrops leucurus</i> através de cromatografia de HPLC, utilizando coluna de Fase Reversa (C-18 u-Bondapak 0,78 x 30 cm - Waters) e λ280nm, evidenciando os picos de 15, 16 e 17 de fosfolipase A ₂ (PLA ₂). | 40 |
| Figura 6.4. Comparação da atividade específica para PLA ₂ em cada pico proveniente das Cromatografias de fase reversa (C-18), troca iônica (DEAE), exclusão molecular (ESCL) e Veneno total (VT BL). Pode-se observar que os picos 15, 16, 17 e 18, oriundos da cromatografia de fase reversa, possuem maior atividade enzimática. | 41 |
| Figura 6.5: Cromatografia do pico 17 proveniente de cromatografia em sistema de HPLC utilizando coluna de fase reversa C18 μ-Boundapak. Calculo da dose dos medicamentos. | 42 |
| Tabela 6.7: Dosagem de Medicamento por Taxa Metabólica Animal. Piroxicam 0,1mg,, ácido acetil salicílico 2,6 mg, paracetamol 1,95mg, dipirona sódica 2,6mg, ibuprofeno 3,12mg, diclofenaco sódico 0,39mg, indometacina 0,52mg e nimesulida 0,26mg | 43 |
| Figura 6.8: Espectro UV-Vis da PLA ₂ F17 | 44 |
| Figura 6.9. Perfil eletroforético do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> e Fosfolipases A ₂ (PLA ₂ -17) em PAGE-SDS 12.5%.MPM- Padrão de massa molecular, VT- Veneno total – PLA ₂ 17 Phospholipase A ₂ pico 17. Todas as demais eletroforeses mostraram uma única banda de peso aproximado em 14 kDa. | 45 |
| Figura 6.10. Ensaio de atividade cinética enzimática com substrato sintético específico para PLA ₂ (4NOBA). A PLA ₂ apresenta uma curva característica para a atividade enzimática, pela variação do nº de moles/min. | 47 |
| Figura 6.11: Avaliação da interação e ou interferência dos AINES sobre a atividade cinética da PLA ₂ , avaliada pela diferença de absorbância provocada pela quebra do substrato 4N3OBA. | 48 |
| Figura 6.12: Determinação da atividade cinética da PLA ₂ F17 sob influência das amostras de 1 a 8 foi realizado para a PLA ₂ incubada com cada amostra. Para todas as oito condições, pode-se observar resultado semelhante ao demonstrado acima. | 49 |

| | |
|--|----|
| Figura 6.13 Atividade miotóxica da PLA ₂ F17 de <i>B. leucurus</i> e amostras de AINES A PLA ₂ nativa apresentou forte efeito miotóxico, sendo superada apenas pelo efeito miotóxico provocado pela amostra 6, todas as outras amostras de anti-inflamatórios, com exceção das amostras 7 e 8, apresentaram atividade miotóxica inferior a 50% da atividade apresentada pela PLA ₂ . | 51 |
| Figura 6.14 Atividade miotóxica da PLA ₂ F17 de <i>B. leucurus</i> e amostras de AINES não incubadas. Com exceção das amostras 6 e 7, todas as demais amostras foram capazes de reduzir a atividade miotóxica da PLA ₂ quando foram injetadas junto com a PLA ₂ . | 52 |
| Figura 6.15 Avaliação da redução da atividade miotóxica, induzida por PLA ₂ s <i>B. leucurus</i> , quando os animais foram tratados com AINES injetados intraperitonealmente. | 53 |
| Figura 6.16 Amostras de PLA ₂ e de AINES injetadas na pata traseira direita dos animais. A PLA ₂ de <i>B. leucurus</i> apresentou intensa e duradoura atividade edematogênica. As amostras de AINES, embora tenham também produzido resposta de intensidade semelhante, não provocou resposta duradoura. | 55 |
| Figura 6.17 A PLA ₂ e <i>B. leucurus</i> , quando injetada juntamente com as amostras de AINES, na pata traseira direita dos animais. | 56 |
| Figura 6.18 Edema de pata induzido por PLA ₂ e tratado por injeção intraperitoneal de AINES. | 57 |
| Figura 6.19 Avaliação da atividade Hemorrágica, determinada pela injeção de 25µL de cada uma das oito amostras nas diferentes condições testadas. | 59 |
| Figura 6.20 Efeito das amostras de AINES e PLA ₂ puras no edema de pele induzido em camundongo. | 61 |
| Figura 6.21 Efeito das amostras de AINES e PLA ₂ na situação não incubada no edema de pele induzido em camundongo. | 62 |
| Figura 6.22 Efeito das amostras de AINES injetados no peritônio e PLA ₂ injetados na pele, para demonstrar o edema de pele induzido em camundongo. | 63 |
| Figura 6.23: Efeito das amostras de AINES e PLA ₂ na atividade de agregação plaquetária. | 64 |

12 ABREVIÇÕES

| | |
|-------------------------------------|--|
| AINES | Anti-inflamatórios não esteroides |
| NSAIDs | Nonsteroidal anti-inflammatory drugs |
| PLA ₂ s A2 | Fosfolipase A2 |
| UV-Vis | Ultra violeta - Visível |
| COX 1 e COX 2 | Ciclooxigenases 1 e 2 |
| His 48 | Histidina 48 |
| HPLC-UV | Cromatografia líquida de alta eficiência em ultra violeta. |
| 4N3OBA E NOBA | Ácido (4-nitro-3-octanoiloxi) benzoico |
| Liso-PAF | Lisofosfolípido |
| 5-LO | Lipoxygenases |
| LTA4, LTB4, LTC4 | Leucotrienos |
| PGG2, PGH2, PGI2, PGD2, PGE2, PGF2α | Prostaglandinas |
| TXA2 | Tromboxanos |

13 ANEXOS

13.1 APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA



Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEAA/Unicamp


CERTIFICADO

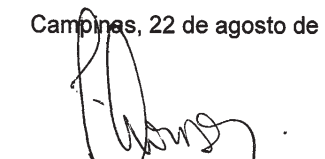
Certificamos que o Protocolo nº **1320-1**, sobre "**Avaliação de antiinflamatórios não esteroidais comerciais (AINES) sobre a atividade e função de PLA2 secretórias isolada dos venenos de *Bothrops sp.***", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama / Eduardo Britto dos Santos Diz Filho**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEAA/Unicamp em **22 de agosto de 2007**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1320-1**, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **august 22, 2007**.

Campinas, 22 de agosto de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

13.2 DECLARAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada Avaliação de anti-inflamatórios não esteroidais comerciais (AINES) sobre a atividade e função de PLA2 secretórias isolada dos venenos de *Bothrops leucurus*.

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição:

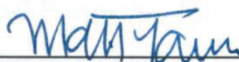
(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 1320-1, Instituição:
Universidade Estadual de Campinas.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluno: (Eduardo Britto dos Santos Diz Filho)



Orientador: (Marcos Hikari Toyama)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



Prof. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

13.3 TRABALHOS PUBLICADOS NO PERIODO

Toxicon 57 (2011) 851–860



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon



Umbelliferone induces changes in the structure and pharmacological activities of Bn IV, a phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedi*

Daniela de Oliveira Toyama^a, Eduardo Britto dos Santos Diz Filho^{b,c}, Benildo Sousa Cavada^d, Bruno Anderson Matias da Rocha^d, Simone Cristina Buzo de Oliveira^{b,c}, Camila Aparecida Cotrim^{b,c}, Veronica Cristina Gomes Soares^{b,c}, Plínio Delatorre^e, Sérgio Marangoni^b, Marcos Hikari Toyama^{c,*}

^a Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, Brazil

^c Laboratório Química de Macromoléculas, UNESP, Campus do Litoral Paulista, Unidade São Vicente, Praça Infante D. Henrique s/n, CEP 11330-900, São Vicente, SP, Brazil

^d Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

^e Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João pessoa, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 November 2010

Received in revised form 20 February 2011

Accepted 22 February 2011

Available online 2 March 2011

Keywords:

Secretory phospholipase A₂ (sPLA₂)

Lys49 PLA₂

Umbelliferone

Anti-PLA₂ activity

ABSTRACT

In this paper was demonstrated that umbelliferone induces changes in structure and pharmacological activities of Bn IV, a lysine 49 secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) from *Bothrops neuwiedi*. Incubation of Bn IV with umbelliferone virtually abolished platelet aggregation, edema, and myotoxicity induced by native Bn IV. The amino acid sequence of Bn IV showed high sequence similarities with other Lys49 sPLA₂s from *B. jararacussu* (BthTx-I), *B. pirajai* (PrTx-I), and *B. neuwiedi pauloensis* (Bn SP6 and Bn SP7). This sPLA₂ also has a highly conserved C-terminal amino acid sequence, which has been shown as important for the pharmacological activities of Lys49 sPLA₂. Sequencing of Bn IV previously treated with umbelliferone revealed modification of S(1) and S(20). Fluorescent spectral analysis and circular dichroism (CD) studies showed that umbelliferone modified the secondary structure of this protein. Moreover, the pharmacological activity of Bn IV is driven by synergism of the C-terminal region with the α -helix motifs, which are involved in substrate binding of the Asp49 and Lys49 residues of sPLA₂ and have a direct effect on the Ca²⁺-independent membrane damage of some secretory snake venom PLA₂. For Bn IV, these interactions are potentially important for triggering the pharmacological activity of this sPLA₂.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Several metabolites special plants interfere with specific molecules or mechanisms, such as inflammatory mediators (arachidonic acid metabolites, peptides, cytokines), production or action of second messengers (cGMP, cAMP,

protein kinases), and release of pro-inflammatory molecules (COX, cytokines) (Nirmal et al., 2008). Polyphenolic compounds, such as flavonoids and coumarins, are classified as special metabolites that are widely distributed in the plant kingdom. Some of these compounds have interesting medicinal properties and exert anti-lipoperoxidant, anti-inflammatory, anti-allergic, antiviral, antibacterial, and/or anticancer effects (Di Carlo et al., 1999). Coumarins are synthesized by several green plants (Murray, 1989) as well

* Corresponding author. Tel./fax: +55 13 3569 9434.

E-mail address: mhtjpn@yahoo.com (M.H. Toyama).

Article

Modulation of the Pharmacological Activities of Secretory Phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* Induced by Naringin

Marcelo L. Santos ¹, Daniela O. Toyama ², Simone C. B. Oliveira ³, Camila A. Cotrim ³, Eduardo B. S. Diz-Filho ³, Fábio H. R. Fagundes ³, Veronica C. G. Soares ³, Ricardo Aparicio ¹ and Marcos H. Toyama ^{4,*}

¹ Laboratório de Biologia Estrutural e Cristalografia, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

² Universidade Presbiteriana Mackenzie, CCBS, São Paulo, Brazil

³ Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

⁴ Laboratório de Macromoléculas Química, UNESP/CLP, São Vicente, São Paulo, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: mhtjpn@yahoo.com; Tel.: +55 13 3469-7682; Fax: + 55 13 3469-7374.

Received: 10 December 2010; in revised form: 4 January 2011 / Accepted: 13 January 2011 /

Published: 18 January 2011

Abstract: In this work we have characterized the action of the naringin, a flavonoid found in grapefruit and known for its various pharmacological effects, which include antioxidant, blood lipid lowering and anticancer activity, on the structure and biochemical activities of a secretory phospholipase A (sPLA2) from *Crotalus durissus cascavella*, an important protein involved in the releasing of arachidonic acid in phospholipid membranes. sPLA2 was incubated with naringin (mol:mol) at 37 °C and a discrete reduction in the UV scanning signal and a modification of the circular dichroism spectra were observed after treatment with naringin, suggesting modifications of the secondary structure of the protein. This flavonoid was able to decrease enzymatic activity and some pharmacological effects, such as myonecrosis, platelet aggregation, and neurotoxic activity caused by sPLA2, however, the inflammatory effect was not affected by naringin. In addition, small angle X-ray scattering (SAXS) data were collected for sPLA2 and naringin-treated sPLA2 to evaluate possible modifications of the protein structure. These structural investigations have shown that sPLA2 is an elongated dimer in solution and after treatment with naringin a conformational change in the dimeric configuration was observed. Our results suggest

The extract of the jellyfish *Phyllorhiza punctata* promotes neurotoxic effects

Raquel Felipe Vasconcelos Carneiro,^a
Nilberto Robson Falcão do Nascimento,^{a*} Paula Priscila Correia Costa,^a
Victor Martins Gomes,^a Alex Jardelino Felizardo de Souza,^b
Simone Cristina Buzzo de Oliveira,^{b,c} Eduardo Britto dos Santos Diz Filho,^{b,c}
Fernando José Zara,^b Manassés Claudino Fonteles,^{a,d}
Daniela de Oliveira Toyama,^d Marcos Hikari Toyama^b and
Cláudia Ferreira Santos^a

ABSTRACT: *Phyllorhiza punctata* (*P. punctata*) is a jellyfish native to the southwestern Pacific. Herewith we present the biochemical and pharmacological characterization of an extract of the tentacles of *P. punctata*. The tentacles were subjected to three freeze–thaw cycles, homogenized, ultrafiltered, precipitated, centrifuged and lyophilized to obtain a crude extract (PHY-N). Paralytic shellfish poisoning compounds such as saxitoxin, gonyautoxin-4, tetrodotoxin and brevetoxin-2, as well as several secretory phospholipase A₂ were identified. PHY-N was tested on autonomic and somatic neuromuscular preparations. In mouse *vas deferens*, PHY-N induced phasic contractions that reached a peak of $234 \pm 34.7\%$ of control twitch height, which were blocked with either 100 μM of phentolamine or 1 mM of lidocaine. In mouse *corpora cavernosa*, PHY-N evoked a relaxation response, which was blocked with either L-N^G-Nitroarginine methyl ester (0.5 mM) or 1 mM of lidocaine. PHY-N (1, 3 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) induced an increase in tonus of the biverter–cervicis neuromuscular preparation that was blocked with pre-treatment of galamine (10 μM). Administration of 6 mg kg^{-1} PHY-N intramuscularly produced death in broilers by spastic paralysis. In conclusion, PHY-N induces nerve depolarization and nonspecifically increases neurotransmitter release. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: neurotoxicity; marine neurotoxic alkaloids; neuromuscular blockade; smooth muscle spasm; spastic paralysis; nitrenergic stimulation

INTRODUCTION

Phyllorhiza punctata is a medusa that belongs to the phylum Cnidaria, class Scyphozoa, order Rhizostomeae, and family Mastigiidae, and is a native marine fauna of the Indo-Pacific Ocean (Rippington and Kelly, 1995). During its bloom, high concentrations may be found along the Brazilian coast (Silveira and Cornelius, 2000; Haddad and Nogueira, 2006), as well as in other environments such as the Gulf of Mexico (Martin and Graham, 2001; Graham *et al.*, 2003). *P. punctata* may have an indirect effect on zooplankton production through changes in chemical or physical properties of the water. The manifestation of surface foam streaks down-wind of a super-swarm is probably due to high dissolved organic material (DOM) loading by the swarm. Mucus shed into the water when jellyfish are concentrated increases the viscosity of the water and may also elevate toxins as mucus-bound nematocysts are discharged (Graham *et al.* 2003). Otherwise, medusae of the scyphomedusan order Rhizostomeae are an important group of planktonic predators and are part of growing 'jellyfish' fisheries in tropical Pacific waters (Hsieh *et al.*, 2001; Omori and Nakano, 2001).

The analysis of fatty acids of *P. punctata* found in Brazilian waters and its component umbrella, oral arms and mucus by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry showed

the presence of sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) and monogalactosyldiacylglycerol (MGDG). The probable origin of MGDG and SQDG in the jellyfish is the result of an endosymbiotic association with a microalga of the Dinoflagellate group, since these lipids are commonly found in photosynthetic membranes (de Souza *et al.*, 2007). This medusa species can have an intrinsic endosymbiotic relationship with zooxanthellae microalgae.

In some sea anemones there is a beneficial symbiotic relationship with unicellular micro algae. This relationship has also been observed between *P. punctata* and unicellular micro algae, which have been located in several parts of the medusa body.

*Correspondence to: N. R. F. do Nascimento, State University of Ceará, Veterinary Medicine, Paranjana Av. 1700, Itaperi, Fortaleza, Brazil, 60740-000
E-mail: nilberto.nascimento@gmail.com

^aUECE, Superior Institute of Biomedicine, Fortaleza, Ceará, Brazil

^bUNESP, Campus Experimental do Litoral Paulista, São Vicente, São Paulo, Brazil

^cUNICAMP, Depto. Bioquímica, Inst. Biologia, Campinas, SP, Brazil

^dUniversidade Mackenzie, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, São Paulo, SP, Brazil



Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase

Alba Fabiola Costa Torres^a, Rodrigo Tavares Dantas^b, Marcos H. Toyama^c, Eduardo Diz Filho^{c,d}, Fernando José Zara^c, Maria Goretti Rodrigues de Queiroz^a, Nadia Accioly Pinto Nogueira^a, Márcia Rosa de Oliveira^e, Daniela de Oliveira Toyama^f, Helena S.A. Monteiro^b, Alice M.C. Martins^{a,*}

^a Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Pharmacy Faculty, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Cell Biological and Chemical of Protein and Peptides Laboratory, Sao Vicente Unity, Campus of Litoral Paulista, Paulista State University (UNESP), Sao Paulo, Brazil

^d Department of Biochemistry, Institute of Biology, UNICAMP, Sao Paulo, Brazil

^e Department of Molecular Biology, Center of Exact Sciences and of the Nature, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

^f Biological and Health Sciences Center, Mackenzie Presbyterian University, Sao Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 June 2009

Received in revised form 9 November 2009

Accepted 12 November 2009

Available online 26 November 2009

Keywords:

L-amino acid oxidase

Phospholipases A₂

Bothrops marajoensis

ABSTRACT

Some proteins present in snake venom possess enzymatic activities, such as phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. In this study, we verify the action of the *Bothrops marajoensis* venom (BmarTV), PLA₂ (BmarPLA₂) and LAAO (BmarLAAO) on strains of bacteria, yeast, and *Leishmania* sp. The BmarTV was isolated by Protein Pack 5PW, and several fractions were obtained. Reverse phase HPLC showed that BmarPLA₂ was isolated from the venom, and N-terminal amino acid sequencing of sPLA₂ showed high amino acid identity with other lysine K49 sPLA₂s isolated from *Bothrops* snakes. The BmarLAAO was purified to high molecular homogeneity and its N-terminal amino acid sequence demonstrated a high degree of amino acid conservation with others LAAOs. BmarLAAO was able to inhibit the growth of *P. aeruginosa*, *C. albicans* and *S. aureus* in a dose-dependent manner. The inhibitory effect was more significant on *S. aureus*, with a MIC = 50 µg/mL and MLC = 200 µg/mL. However, the BmarTV and BmarPLA₂ did not demonstrate inhibitory capacity. BmarLAAO was able to inhibit the growth of promastigote forms of *L. chagasi* and *L. amazonensis*, with an IC₅₀ = 2.55 µg/mL and 2.86 µg/mL for *L. amazonensis* and *L. chagasi*, respectively. BmarTV also provided significant inhibition of parasitic growth, with an IC₅₀ of 86.56 µg/mL for *L. amazonensis* and 79.02 µg/mL for *L. chagasi*. BmarPLA₂ did not promote any inhibition of the growth of these parasites. The BmarLAAO and BmarTV presented low toxicity at the concentrations studied. In conclusion, whole venom as well as the L-amino acid oxidase from *Bothrops marajoensis* was able to inhibit the growth of several microorganisms, including *S. aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Leishmania* sp.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Snake venoms are composed of active substances that present a diversity of biological effects such as neurotoxicity, myotoxicity, cardiotoxicity, hemorrhagic effects, pro- and anticoagulants, antiparasitic and antibacterial

* Corresponding author at: Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará CEP-60.420-970, Brazil. Tel.: +55 85 3366 8263; fax: +55 85 3366 8292.

E-mail address: martinsalice@gmail.com (A.M.C. Martins).

Effects of Low Molecular Weight Sulfated Galactan Fragments From *Botryocladia Occidentalis* on the Pharmacological and Enzymatic Activity of Spla2 From *Crotalus Durissus Cascavella*

M. H. Toyama · D. O. Toyama · V. M. Torres ·
G. C. Pontes · W. R. L. Farias · F. R. Melo · S. C. B. Oliveira ·
F. H. R. Fagundes · E. B. S. Diz Filho · B. S. Cavada

Published online: 9 November 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract Low molecular weight fragments of sulfated galactans (Boc-5 and Boc-10) from the red algae *Botryocladia occidentalis* significantly inhibited *Crotalus durissus cascavella* sPLA2 enzymatic activity. Equimolar ratios of sPLA2 to Boc-5 or Boc-10 resulted in allosteric inhibition of sPLA2. Under the conditions tested, we observed that both Boc-5 and Boc-10 strongly decreased edema, myonecrosis, and neurotoxicity induced by native sPLA2.

Key words *Botryocladia occidentalis* · *Crotalus durissus cascavella* · Secretory phospholipase A2 (sPLA2) · Edema · Myonecrosis

Abbreviations

| | |
|-------------------------------|---|
| sPLA2 | Secretory phospholipase A2 |
| Boc | Sulfated galactan fragment of <i>Botryocladia occidentalis</i> |
| <i>B. occidentalis</i> | <i>Botryocladia occidentalis</i> |
| <i>C. durissus cascavella</i> | <i>Crotalus durissus cascavella</i> |
| SDS–PAGE | sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| Maldi-Tof | Matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometer |
| CD | Circular dichroism |
| HPLC | High-performance liquid chromatography or high-pressure liquid chromatography |
| [¹⁴ C] 5-HT | [¹⁴ C] 5-hydroxytryptamine |
| CK | Creatine kinase |

M. H. Toyama · S. C. B. Oliveira · F. H. R. Fagundes ·
E. B. S. Diz Filho
UNESP, Campus do Litoral Paulista, São Vicente, Brasil

D. O. Toyama
Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, Brasil

V. M. Torres · G. C. Pontes · W. R. L. Farias
Departamento de Engenharia de Pesca and/BioMol/BioMar,
UFC, Fortaleza, Ceará, Brasil

F. R. Melo
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF)/UFRJ,
Rio de Janeiro, Brasil

S. C. B. Oliveira · F. H. R. Fagundes · E. B. S. Diz Filho (✉)
Departamento de Bioquímica Inst. Biologia, Unicamp
Campinas, São Paulo, Brasil
e-mail: eduardodizfilho@gmail.com

B. S. Cavada
Departamento de Bioquímica, UFC, São Paulo, Brasil

Sulfated polysaccharides are involved in several biological processes due to their interaction with, and inhibition of, proteins [25]. Sulfated polysaccharides are found in marine red algae (Rhodophyta), invertebrates, and sea grass [3] and [18]. Boc, a sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* (Boc) collected from the Brazilian coast, has been characterized by Farias et al. [5]. Boc is hydrolyzed to give low molecular weight fragments of 5 kDa (Boc-5) and 10 kDa (Boc-10).

Phospholipase A2 enzymes (PLA2s) are found in high concentrations in mammalian pancreatic fluids and snake venoms. Snake venom PLA2s usually possess varying degrees of enzymatic and toxic activity: some toxic activities are connected with hydrolytic activity, which



Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2

Camila Aparecida Cotrim^{a,*}, Simone Cristina Buzzo de Oliveira^a, Eduardo B.S. Diz Filho^a, Fabiana Vieira Fonseca^a, Lineu Baldissera Jr.^b, Edson Antunes^b, Rafael Matos Ximenes^c, Helena Serra Azul Monteiro^c, Marcelo Montenegro Rabello^d, Marcelo Zaldini Hernandez^d, Daniela de Oliveira Toyama^e, Marcos Hikari Toyama^f

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

^b Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

^c Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas (LAFAVET), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^d Laboratório de Química Teórica Medicinal – LQTM, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^e Universidade Presbiteriana Mackenzie, CCBS, São Paulo, Brazil

^f Campus Experimental do Litoral Paulista – UNESP, São Vicente, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2010

Received in revised form 27 October 2010

Accepted 29 October 2010

Available online 4 November 2010

Keywords:

sPLA

Crotalus durissus terrificus

Quercetin

Pharmacological sites

Molecular docking

ABSTRACT

As polyphenolic compounds isolated from plants extracts, flavonoids have been applied to various pharmaceutical uses in recent decades due to their anti-inflammatory, cancer preventive, and cardiovascular protective activities. In this study, we evaluated the effects of the flavonoid quercetin on *Crotalus durissus terrificus* secretory phospholipase A2 (sPLA2), an important protein involved in the release of arachidonic acid from phospholipid membranes. The protein was chemically modified by treatment with quercetin, which resulted in modifications in the secondary structure as evidenced through circular dichroism. In addition, quercetin was able to inhibit the enzymatic activity and some pharmacological activities of sPLA2, including its antibacterial activity, its ability to induce platelet aggregation, and its myotoxicity by approximately 40%, but was not able to reduce the inflammatory and neurotoxic activities of sPLA2. These results suggest the existence of two pharmacological sites in the protein, one that is correlated with the enzymatic site and another that is distinct from it. We also performed molecular docking to better understand the possible interactions between quercetin and sPLA2. Our docking data showed the existence of hydrogen-bonded, polar interactions and hydrophobic interactions, suggesting that other flavonoids with similar structures could bind to sPLA2. Further research is warranted to investigate the potential use of flavonoids as sPLA2 inhibitors.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Phospholipases A2 (PLA2, EC 3.1.1.4) are small proteins that catalyze the hydrolysis of glycerophospholipids at the sn-2 position in a Ca²⁺-dependent reaction, releasing lysophospholipids and fatty acids [1–3]. These enzymes are the main component of snake venom and have been investigated not only because they have a wide range of biological effects, but also due to their similar-

ity to mammalian phospholipases [4,5]. However, in contrast to their mammalian counterparts, several snake venom PLA2s are toxins that induce pharmacological effects [6] through arachidonic acid metabolism leading to the production of various lipid pro-inflammatory mediators such as prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes [7]. Recent studies have shown that inhibition of cytosolic PLA2 (cPLA2) leads to a decrease in eicosanoid levels and, reduced inflammation [8].

Due to the role of PLA2s in the inflammatory process, there is pharmacological interest in PLA2 inhibitors, and among these, the flavonoids have been successfully studied. Flavonoids are widely produced in plants tissues making them suitable targets for pharmaceutical extraction and chemical synthesis [8,9]. The inhibitory effect of flavonoids on secretory PLA2 (sPLA2) was reported by Gil et al. [10], and Lindahl and Tagesson [11]. Their results showed that inhibition of sPLA2 from different sources following incubation with various flavonoids is dependent on the 5-hydroxyl group as well as the double bond and the double-bonded oxygen in the oxane ring, and that the hydroxyl groups at the 3'- and 4'-

* Corresponding author at: Instituto de Biologia – UNICAMP, Rua Monteiro Lobato, 255 – Cidade Universitária Zeferino Vaz, Zip Code: 13083-862, Campinas, SP, Brazil. Tel.: +55 19 3521 6132.

E-mail addresses: camilacotrim@yahoo.com.br (C.A. Cotrim), simonebuzzo@hotmail.com (S.C.B. de Oliveira), eduardodizfilho@gmail.com (E.B.S. Diz Filho), fvmacieira@yahoo.com.br (F.V. Fonseca), libajunior@hotmail.com (L. Baldissera Jr.), edson.antunes@uol.com.br (E. Antunes), rmximenes@hotmail.com (R.M. Ximenes), hsazul@gmail.com (H.S.A. Monteiro), marcelorabello@globo.com (M.M. Rabello), zaldini@ufpe.br (M.Z. Hernandez), gaveiraf@mackenzie.br (D. de Oliveira Toyama), mhtjpn@yahoo.com (M.H. Toyama).



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicol

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicol

Short communication

Effect of the synthetic coumarin, ethyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate, on activity of *Crotalus durissus ruruima* sPLA2 as well as on edema and platelet aggregation induced by this factor

F.V. Fonseca^{a,f}, L. Baldissera Jr.^b, E.A. Camargo^b, E. Antunes^b, E.B.S. Diz-Filho^{a,f}, A.G. Corrêa^c, L.O.S. Beriam^d, D.O. Toyama^e, C.A. Cotrim^{a,f}, M.H. Toyama^{f,*}

^a Biochemistry Department, Institute of Biology, UNICAMP, Campinas, Brazil

^b Pharmacology Department, Faculty Medicine, UNICAMP, Campinas, Brazil

^c Department of Chemistry, UFScar, Brazil

^d Laboratory of Vegetal Bacteriology, Centro Experimental do Instituto Biológico, Campinas, São Paulo, Brazil

^e CCBS, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, Brazil

^f UNESP, Campus Experimental do Litoral Paulista, São Vicente, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 November 2009

Received in revised form 1 March 2010

Accepted 3 March 2010

Available online 16 March 2010

Keywords:

Crotalus durissus ruruima

Edema

Myonecrosis

Platelet

sPLA2

Synthetic coumarin

ABSTRACT

We show that ethyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (EOCC), a synthetic coumarin, irreversibly inhibits phospholipase A₂ (sPLA2) from *Crotalus durissus ruruima* venom (sPLA2r) with an IC₅₀ of 3.1 ± 0.06 nmol. EOCC strongly decreased the V_{max} and K_m, and it virtually abolished the enzyme activity of sPLA2r as well as sPLA2s from other sources. The edema induced by sPLA2r + EOCC was less than that induced by sPLA2r treated with *p*-bromophenacyl bromide, which was more efficient at neutralizing the platelet aggregation activity of native sPLA2r. Native sPLA2r induced platelet aggregation of $91.54 \pm 9.3\%$, and sPLA2r + EOCC induced a platelet aggregation of $18.56 \pm 6.5\%$. EOCC treatment also decreased the myotoxic effect of sPLA2r. Mass spectrometry showed that EOCC formed a stable complex with sPLA2r, which increased the mass of native sPLA2r from 14,299.34 Da to 14,736.22 Da. Moreover, the formation of this complex appeared to be involved in the loss of sPLA2r activity. Our results strongly suggest that EOCC can be used as a pharmacological agent against the sPLA2 in *Crotalus durissus sp.* venom as well as other sPLA2s.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

2H-1-benzopyrans (2H-chromenes) are important intermediates in the synthesis of many natural products and medicinal agents (Ashwood et al., 1986; Kim and Lee, 2002) including flavonoids, coumarin, and derivatives of these compounds. 2-H chromenes have been used experimentally

as anti-inflammatory and anti-thrombotic therapeutics. Related to their anti-inflammatory activity, synthetic coumarins are known to inhibit arachidonic acid metabolism. *Crotalus durissus sp.* venom has several pharmacological effects that appear dependent, at least in part, on the enzymatic activity of secretory phospholipase A₂ (sPLA2). The aim of this work was to evaluate the effect of ethyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (EOCC), a synthetic coumarin derivative, on the enzymatic activity of sPLA2 from *Crotalus durissus ruruima* venom (sPLA2r) as well as on sPLA2r-induced edema, myotoxicity, and platelet aggregation.

Secretory PLA2r was fractionated in two steps as described by Diz Filho et al. (2009). Whole venom (45 mg)

Abbreviations: CK, creatine kinase; EOCC, ethyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate; 7-HOC, 7-hydroxycoumarin; pBPB, *p*-bromophenacyl bromide; PLA2, phospholipase A₂; sPLA2, secretory phospholipase A₂; sPLA2r, secretory phospholipase A₂ from *Crotalus durissus ruruima*.

* Corresponding author. UNESP, Campus do Litoral Paulista, Pça. Infante D. Henrique, s/n° CEP 11330-900, São Vicente, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 13 3569 9400; fax: +55 13 3569 9446.

E-mail address: mhtjpn@yahoo.com (M.H. Toyama).

Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops leucurus* snake venom

Torres AFC (1), Dantas RT (2), Menezes RRPPB (1) Toyama MH (3), Filho ED (4), Oliveira MF (1), Nogueira NAP (1), Oliveira MR (5), Monteiro HSA (2), Martins AMC (1)

(1) Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará State, Brazil; (2) Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará State, Brazil; (3) Laboratory of Cell Biology and Chemistry for Proteins and Peptides, São Paulo Experimental Coast Campus, São Paulo State University (UNESP – Univ Estadual Paulista), São Vicente, São Paulo State, Brazil; (4) Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo State, Brazil; (5) Department of Molecular Biology, Center of Exact Sciences and Nature, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba State, Brazil.

Abstract: Some snake venom proteins present enzymatic activities, such as L-amino acid oxidase (LAAO). The aim of this paper was to investigate the effect of *Bothrops leucurus* total venom (BleuTV) and its fraction LAAO (BleuLAAO) on bacteria, yeast, and promastigote forms of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*, and epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. BleuTV was isolated with a Protein Pack 5PW® (Waters Corporation, USA), and several fractions were obtained. BleuLAAO was purified to high molecular homogeneity, and its N-terminal amino acid sequence shared a high degree of amino acid conservation with other LAAOs. BleuTV inhibited *Staphylococcus aureus* growth in a dose-dependent manner, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 25 µg/mL, which corresponded to its minimum lethal concentration (MLC). BleuTV also inhibited the growth of promastigote forms of *L. chagasi* and *L. amazonensis*, with respective IC₅₀ values of 1.94 µg/mL and 5.49 µg/mL. Furthermore, it repressed *T. cruzi* growth with an IC₅₀ of 1.14 µg/mL. However, BleuLAAO did not inhibit the growth of the microorganisms studied and was not toxic to macrophages. BleuTV had low toxicity against macrophages at the concentrations studied. In conclusion, whole venom from *Bothrops leucurus* inhibited the growth of some microorganisms, including *S. aureus*, *Leishmania* sp., and *T. cruzi*.

Key words: L-amino oxidase, *Bothrops leucurus*, antimicrobial activity.

INTRODUCTION

Members of the genus *Bothrops* are present in several ecosystems and include approximately 20 species. The main snakes of this genus are *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. asper*, *B. alternatus*, *B. marajoensis* and *B. leucurus* (1).

Snake venom contains numerous components of biological and/or biotechnological value. Venom is a complex mixture that varies in proportions and characteristics among different species and contains both non-protein and protein components with different structures and specific biochemical activities (2, 3). The major protein components of the venom are

neurotoxins, cardiotoxins, lectins, disintegrins, natriuretic peptides, proteases, phospholipases, phosphodiesterases, nucleotidases, and L-amino acid oxidases (2). Venom enzymes induce various pharmacological effects including neurotoxic, myotoxic, cardiotoxic, hemorrhagic, hemolytic, procoagulant and anticoagulant (4, 5).

L-Amino acid oxidase (L-amino acid: O₂ oxidoreductase, EC 1.4.3.2) is a flavoenzyme that catalyzes the oxidative deamination of an L-amino acid substrate into an α-keto acid with the production of ammonia and hydrogen peroxide. LAAO is the only FAD-dependent oxidase found in snake venom, and venom toxicity may be related to the hydrogen peroxide

A Trypsin Inhibitor from *Sapindus saponaria* L. Seeds: Purification, Characterization, and Activity Towards Pest Insect Digestive Enzyme

Maria Lígia R. Macedo · Eduardo B. S. Diz Filho ·
Mariadas Graças M. Freire · Maria Luiza V. Oliva ·
Joana T. Sumikawa · Marcos H. Toyama · Sérgio Marangoni

Published online: 3 December 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract The present paper describes the purification, characterization and determination of the partial primary structure of the first trypsin inhibitor isolated from the family Sapindaceae. A highly stable, potent trypsin inhibitor (SSTI) was purified to homogeneity. SDS–PAGE analysis revealed that the protein consists of a two-polypeptide chain with molecular masses of approximately 15 and 3 kDa. The purified inhibitor inhibited bovine trypsin at a 1:1 M ratio. Kinetic analysis revealed that the protein is a competitive inhibitor with an equilibrium dissociation constant of 10^{-9} M for trypsin. The partial NH₂-terminal sequence of 36 amino acids in SSTI indicates homology with other members of the trypsin-inhibitor family from different sources. This inhibitor is highly stable in the presence of denaturing agents. SSTI showed significant inhibitory activity against trypsin-like proteases present in

the larval midgut on *Anagasta kuehniella*, *Corcyra cephalonica*, *Diatraea saccharalis* and *Anticarsia gemmatilis*.

Keywords Trypsin inhibitor · Sapindaceae · Lepidopteran · Kinetic studies

Abbreviations

| | |
|-------|---|
| BAPNA | N- α -benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide |
| BPTI | Bovine pâncreas trypsin inhibitor |
| BSA | Bovine serum albumin |
| BTPNA | N-benzoyl-L-tyrosine-p-nitroanilide |
| CHD | 1,2-cyclohexanedione |
| CNBr | Cyanogen bromide |
| DTT | Dithiothreitol |
| HEPES | [4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid] |
| HNE | Human neutrophil elastase |
| PTC | Phenylisothiocyanate |
| SBTI | Soybean trypsin inhibitor |
| TFA | Acetonitrile and trifluoroacetic acid |
| TLCK | Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone |
| TNBS | Trinitrobenzenesulphonic acid |

M. L. R. Macedo (✉)
Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções
Biológicas, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Saúde
Pública, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade
Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Cidade Universitária
S/N, Caixa Postal 549, Campo Grande, MS CEP 79070-900,
Brazil
e-mail: bioplant@terra.com.br

E. B. S. Diz Filho · M. H. Toyama · S. Marangoni
Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Unicamp,
Campinas, SP, Brazil

M. G. M. Freire
Laboratório de Química e Biomoléculas, Centro de Pesquisa,
Institutos Superiores do CENSA, Campos dos Goytacazes, RJ,
Brazil

M. L. V. Oliva · J. T. Sumikawa
Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina,
UNIFESP, São Paulo, Brazil

1 Introduction

Sapindus saponaria (Sapindaceae) is a very abundant species in the state of São Paulo and other regions of Brazil. The fruit of *S. saponaria* has a high content of glycosides which possess well-defined regions with a both hydrophobic and hydrophilic feature denominated an amphiphilic molecule. This molecule can form foam with chemical properties equal to those of surfactants. Although the fruit is somewhat poisonous, preparations made from



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A₂

Inez Liberato Evangelista^a, Alice Maria Costa Martins^b, Nilberto Robson Falcão Nascimento^c, Alexandre Havt^a, Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista^c, Terentia Batista Sá de Norões^a, Marcos Hikari Toyama^d, Eduardo Brito Diz-Filho^e, Daniela de Oliveira Toyama^f, Manassés Claudino Fonteles^f, Helena Serra Azul Monteiro^{a,*}

^a Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Veterinary Faculty, Estadual University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^d São Vicente Unit, Paulista Coastal Campus, São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil

^e São Vicente Unit, Campus of Litoral Paulista, Paulista State University; São Paulo, Brazil

^f Biological Science, Exact and Experimental Faculty, Presbyterian Mackenzie University, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 August 2009

Received in revised form 1 December 2009

Accepted 3 December 2009

Available online 28 December 2009

Keywords:

Bothrops marajoensis

Phospholipase A₂

Kidney

Heart

Pressure

ABSTRACT

Bothrops marajoensis is found in the savannah of Marajó Island in the State of Pará and regions of Amapá State, Brazil. The aim of the work was to study the renal and cardiovascular effects of the *B. marajoensis* venom and phospholipase A₂ (PLA₂). The venom was fractionated by Protein Pack 5PW. N-terminal amino acid sequencing of sPLA₂ showed amino acid identity with other lysine K49 sPLA₂s of snake venom. *B. marajoensis* venom (30 µg/mL) decreased the perfusion pressure, renal vascular resistance, urinary flow, glomerular filtration rate and sodium tubular transport. PLA₂ did not change the renal parameters. The perfusion pressure of the mesenteric bed did not change after infusion of venom. In isolated heart, the venom decreased the force of contraction and increased PP but did not change coronary flow. In the arterial pressure, the venom and PLA₂ decreased mean arterial pressure and cardiac frequency. The presence of atrial flutter and late hyperpolarisation reversed, indicating QRS complex arrhythmia and dysfunction in atrial conduction. In conclusion, *B. marajoensis* venom and PLA₂ induce hypotension and bradycardia while simultaneously blocking electrical conduction in the heart. Moreover, the decrease in glomerular filtration rate, urinary flow and electrolyte transport demonstrates physiological changes to the renal system.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Venoms from species of Brazilian snakes present variability in their composition and biological effects. The genus *Bothrops* is responsible for the majority of snakebite accidents in Brazil (Queiroz et al., 2008). Its venom can cause clinical manifestations as prominent local tissue damage,

coagulopathy, hypovolemia, hemodynamic instability and shock, as well as acute renal failure (Ownby and Colberg, 1990; Bjarnason and Fox, 1994; Gutiérrez et al., 2009).

Snake venoms are rich sources of phospholipase A₂ (PLA₂) enzymes (EC 3.1.1.4.), which catalyse the hydrolysis of glycerophospholipids at the sn-2 position, releasing lysophospholipids and fatty acids (Kini, 2003). They can be classified, based on their cellular localization, as follows: (I) cytosolic (cPLA₂); (II) secretory Ca⁺²-dependent (sPLA₂); and (III) intracellular Ca⁺²-independent (i PLA₂) (Chakraborti, 2003; Balsinde et al., 2006; Higuchi et al., 2006).

* Corresponding author. Tel.: +85 3366 8437; fax: +85 2815212.

E-mail addresses: martinsalice@gmail.com (A.M. Costa Martins), helena.monteiro@ufc.br (H.S. Azul Monteiro).



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A2 (sPLA2) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom

D.O. Toyama^a, S. Marangoni^b, E.B.S. Diz-Filho^b, S.C.B. Oliveira^b, M.H. Toyama^{c,*}

^a Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Mackenzie, São Paulo, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, Brazil

^c Laboratório Química de Macromoléculas, UNESP, Campus do Litoral Paulista, Unidade São Vicente, Praça Infante D. Henrique s/n° CEP 11330-900, São Vicente, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2008

Received in revised form 11 December 2008

Accepted 23 December 2008

Available online 16 January 2009

Keywords:

Secretory phospholipase A2 (sPLA2)

Umbelliferone (7-HOC)

Snake venom

Anti-venom

Anti-inflammatory

Circular dichroism

ABSTRACT

Flavonoids, coumarins and other polyphenolic compounds are powerful antioxidants both in hydrophilic and lipophilic environments with diverse pharmacological properties including anti-inflammatory activity. Despite being widely used as powerful therapeutic agents for blood coagulation disorders, more specifically to control some serine protease enzymes, the mechanism of anti-inflammatory activity of coumarins is unknown, unlike that of flavonoids. Although their controlling effect on serine proteases is well acknowledged, their action on secretory phospholipase A2 (sPLA2) remains obscure. The present study describes the interaction between umbelliferone (7-HOC) and the sPLA2 from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *In vitro* inhibition of sPLA2 enzymatic activity by 7-HOC was estimated using 4N3OBA as substrate, resulting in an irreversible decrease in such activity proportional to 7-HOC concentration. The biophysical interaction between 7-HOC and sPLA2 was examined by fluorescent spectral analysis and circular dichroism studies. Results from both techniques clearly showed that 7-HOC strongly modified the secondary structure of this enzyme and CD spectra revealed that it strongly decreased sPLA2 alpha-helical conformation. In addition, two-dimensional electrophoresis indicated an evident difference between HPLC-purified native and 7-HOC-treated sPLA2s, which were used in pharmacological experiments to compare their biological activities. *In vivo* anti-inflammatory activity was assessed by the sPLA2-induced mouse paw edema model, in which 7-HOC presented an effect similar to those of dexamethasone and cyproheptadine against the pro-inflammatory effect induced by native sPLA2 on the mouse paw edema, mast cell degranulation and skin edema. On the other hand, 7-HOC exhibited a more potent inhibitory effect on sPLA2 than that of *p*-bromophenacyl bromide (*p*-BPPB). Our data suggest that 7-HOC interacts with sPLA2 and causes some structural modifications that lead to a sharp decrease or inhibition of the edematogenic and myotoxic activities of this enzyme, indicating its potential use to suppress inflammation induced by sPLA2 from the snake venom.

© 2008 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Polyphenolic compounds, such as flavonoids and coumarins, are widely distributed in the plant kingdom. Some of these compounds have interesting medicinal

* Corresponding author. Tel.: +55 13 3569 9434; fax: +55 13 3469 7374.
E-mail address: mhtjpn@yahoo.com (M.H. Toyama).



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Enzymatic and structural characterization of new PLA2 isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*

E.B.S. Diz Filho^{a,d,*}, S. Marangoni^{a,d}, D.O. Toyama^b, F.H.R. Fagundes^{a,d}, S.C.B. Oliveira^{a,d}, F.V. Fonseca^{a,d}, A.K. Calgarotto^a, P.P. Joazeiro^c, M.H. Toyama^d

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil

^b Faculdade de Ciências Biológicas, Exatas e Experimentais, Universidade Mackenzie, São Paulo, Brazil

^c Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil

^d Campus Experimental do Litoral Paulista – UNESP, São Vicente, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2008

Received in revised form 12 October 2008

Accepted 22 October 2008

Available online 26 October 2008

Keywords:

Crotalus durissus ruruima

Calcium binding

Venom

PLA2

Calcium binding loop

ABSTRACT

This work reports the structural and enzymatic characterization of a new sPLA2 from the white venom of *Crotalus durissus ruruima*, nominated PLA2A. The homogeneity of the PLA2A fraction and its molecular mass were initially evaluated by SDS-PAGE and confirmed by MALDI-TOF spectrometry, indicating a molecular mass of 14,299.34 Da. Structural investigation, through circular dichroism spectroscopy, revealed that PLA2A has a high content of alpha helix and beta-turn structures, 45.7% and 35.6% respectively. Its amino acid sequence, determined by Edman degradation and “*de novo amino acid sequencing*”, exhibited high identity to PLA2 Cdt F15 from *Crotalus durissus terrificus*. The enzymatic investigation, conducted using the synthetic substrate 4-nitro-3-(octanoyloxy)-benzoic acid, determined its V_{max} (7.56 nmoles/min) and K_M (2.76 mM). Moreover, PLA2A showed an allosteric behavior and its enzymatic activity was dependent on Ca^{2+} . Intrinsic fluorescence measurements suggested that Ca^{2+} induced a significant increase of PLA2A fluorescence, whereas its replacement for Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sn^{2+} and Cd^{2+} apparently induced no structural modifications. The optimal pH and temperature for the enzymatic activity of PLA2A were 8.4 and 40 °C, respectively, and the minimal concentration of p-BPB and crotopotin that significantly inhibited such activity was 0.75 mM and 0.4 μM, respectively. In addition, PLA2A showed a significant antibacterial effect that was not strictly dependent on the enzymatic activity of such sPLA2.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Crotalus durissus venom is a complex mixture of substances, such as crotamine, gyroxin, crotoxin (a complex formed by phospholipase A2 and crotopotin), tissue Kallikrein-like activity, trombine-like enzyme, phosphodiesterase, 5'-nucleotidase, L-amino oxidase, convulsin, and peptides (Bercovici et al., 1987). Barrio (1954) analyzed

samples of *Crotalus durissus terrificus* from several parts of Brazil and found three different types of electrophoretic profiles. His study allowed him to divide these snakes according to their origin into northern, central, and southern populations. He reported that the venom of specimens collected in southern Brazil differed from others on the presence of crotamine (Barrio, 1954). Gonçalves and Vieira (1950) also showed variation in *C. d. terrificus* venom composition related to geographical origin of specimens. In *C. durissus*, interspecific variability has been demonstrated for *C. d. terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus* rattlesnakes (Santoro et al., 1999). Interspecific variations have been also reported in pools of

* Corresponding author. Campus Experimental do Litoral Paulista – UNESP, Praça Infante DOM Henrique s/n, Campus do Litoral Paulista, 13070770 São Vicente, Brazil. Tel.: +55 19 3521 6132.

E-mail address: eduardodizfilho@gmail.com (E.B.S. Diz Filho).

Purification and renal effects of phospholipase A₂ isolated from *Bothrops insularis* venom[☆]

Marcus Davis Machado Braga^a, Alice Maria Costa Martins^b,
Claudênio Diógenes Alves^b, Dalgimar Beserra de Menezes^a, René Duarte Martins^c,
Paulo Sérgio Ferreira Barbosa^c, Isadora Maria de Sousa Oliveira^c,
Marcos Hikari Toyama^d, Daniela Oliveira Toyama^e,
Eduardo Brito dos Santos Diz Filho^d, Fabio Henrique Ramos Fagundes^d,
Manassés Claudino Fonteles^e, Helena Serra Azul Monteiro^{c,*}

^aDepartment of Pathology, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceará, Brazil

^bDepartment of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceará, Brazil

^cDepartment of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceará, Brazil

^dSão Vicente Unity, Campus of Litoral Paulista, Paulista State University (UNESP), São Paulo, Brazil

^eBiological Science, Exact and Experimental Faculty, Presbyterian Mackenzie University, São Paulo, Brazil

Received 30 May 2007; received in revised form 21 August 2007; accepted 31 August 2007

Available online 11 September 2007

Abstract

Bothrops insularis venom contains a variety of substances presumably responsible for several pharmacological effects. We investigated the biochemical and biological effects of phospholipase A₂ protein isolated from *B. insularis* venom and the chromatographic profile showed 7 main fractions and the main phospholipase A₂ (PLA₂) enzymatic activity was detected in fractions IV and V. Fraction IV was submitted to a new chromatographic procedure on ion exchange chromatography, which allowed the elution of 5 main fractions designated as IV-1 to IV-5, from which IV-4 constituted the main fraction. The molecular homogeneity of this fraction was characterized by high-performance liquid chromatography (HPLC) and demonstrated by mass spectrometry (MS), which showed a molecular mass of 13984.20 Da; its N-terminal sequence presented a high amino acid identity (up to 95%) with the PLA₂ of *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper*. Phospholipase A₂ isolated from *B. insularis* (Bi PLA₂) venom (10 µg/mL) was also studied as to its effect on the renal function of isolated perfused kidneys of Wistar rats ($n = 6$). Bi PLA₂ increased perfusion pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), urinary flow (UF) and glomerular filtration rate (GFR). Sodium (%TNa⁺) and

[☆] *Ethical statement:* The experiments follow the methodology recommended by the international ethical standards of the scientific committee of our university (Comitê de Ética e Pesquisa com Animais).

*Corresponding author. Unidade de Pesquisas Clínicas/UFC, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, CP 3229 Fortaleza, Ce 60420-970, Brazil. Tel.: +55 85 3223 6982; fax: +55 85 32815212.

E-mail addresses: serrazul@baydenet.com.br, martinsalice@gmail.com (H.S. Azul Monteiro).

Z12**Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation**

Walter Cavalcante¹, Tayná Oliveira¹, Maeli Dal Pai-Silva¹, Paulo Pereira², Clayton Oliveira³, Andreimar Soares³, Márcia Gallacci¹

¹ University Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil; ² UNAERP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; ³ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Although specific antivenom is the mainstay of medical treatment for snakebite envenomations, it is important to search for different venom inhibitors that could complement or substitute for the action of antivenoms. Aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Cs) has been shown to inhibit enzymatic and biological properties of several snake venoms and purified phospholipase A₂ (PLA₂) toxins. The skeletal neuromuscular junction is one of the major targets of PLA₂ toxins. In this work, we evaluated the influence of Cs aqueous extract upon the neuromuscular blocking and the muscle damaging activities of some PLA₂s [crotoxin (CTX) from *C. durissus terrificus*, bothropstoxin-I (BthTX-I) from *B. jararacussu*, piratoxin-I (PrTX-I) from *B. pirajai* and myotoxin-II (MjTX-II) from *B. moojenii*] in mice phrenic-diaphragm preparations. Data (mean ± S.E.M., *n* = 3–8) were analyzed by ANOVA (*p* < 0.05). CTX (0.5 μM) and all others PLA₂ (1.0 μM) induced irreversible and time-dependent blockade of twitches. Except CTX, all PLA₂s induced significant indices of muscle damage, assessed by microscopic analysis. Preincubation of BthTX-I, PrTX-I or MjTX-II with Cs (1:5, w/w, for 30 min at 37 °C) significantly prevented the neuromuscular blockade of preparations exposed to the mixtures for 90 min; the extent of protection ranged from 93% to 97%. The Cs extract also neutralized the muscle damage (protection of 80–94%). Higher concentration of the extract (1:10, w/w) was necessary to neutralize the neuromuscular blockade induced by CTX in 90%. These findings expanded the spectrum of Cs antivenom activities, evidencing that it could be a good source of potentially useful PLA₂ inhibitors.

doi:10.1016/j.toxlet.2007.05.569

Z13**Comparison of the neurotoxic effects of venoms and crototoxins from two subspecies of crotalus snakes on mouse neuromuscular junction**

Walter Cavalcante¹, Eduardo Santos-Diz-Filho², Tayná Oliveira¹, F Romero-Vargas², Luis Ponce-Soto², Sérgio Marangoni², Léa Rodrigues-Simioni², Maeli Dal Pai-Silva¹, Márcia Gallacci¹

¹ University Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil; ² University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

The *Crotalus durissus* complex of snakes has a wide distribution in South America. *Crotalus* venoms present a potent neurotoxic activity, which is expressed mainly by crotoxin (CTX), their major toxin. In this study, we compared the neuromuscular activity of venoms from two subspecies of *Crotalus* genus, *C.d. cumanensis* (Cdc) and *C.d. ruruima* (Cdr), on mouse phrenic nerve-diaphragm muscle preparations (PNDp). The preparations were mounted in a 15 ml organ bath with Ringer solution, aerated with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂) at 37 °C. Paralyzing activity was evaluated through the recording of directly and indirectly evoked twitches in PNDp. Data (mean ± S.E.M.; *n* = 4–6) were analysed by ANOVA (*p* < 0.05). Both venoms and their CTX induced an irreversibly and concentration-dependent blockade of indirect twitches. However, only Cdc venom blocked direct contractions. The paralyzing activity of Cdc venom was always preceded by a facilitation of both direct and indirect contractions. The time (minutes) required for Cdc venom to produce 50% of blockade (*t*_{1/2}) of indirect twitches ranged from 87.11 ± 8.8% (1 μg/ml) to 36.47 ± 1.76% (10 μg/ml), and for direct contractions it was 70.5 ± 6.8 (10 μg/ml). For Cdr venom, *t*_{1/2} was higher than 90 min (5 μg/ml), and it was 53.79 ± 8.58% (10 μg/ml). The data obtained until this moment showed that both venoms presented neurotoxic activities, and these effects could be attributed to their respective CTXs. The present results also indicate that the venom of Cdc is more potent than that of Cdr snake.

doi:10.1016/j.toxlet.2007.05.570

Z14**Polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes in Turkish population**

Sebnem S. Cecen, Zeliha Kayaalti, Tulin Soylemezoglu