



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**FREY FRANCISCO ROMERO VARGAS**

“Caracterização estrutural e funcional da fosfolipase A<sub>2</sub>, BtTX-II,  
purificada do veneno da serpente *Bothriopsis taeniata*”

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Frey Francisco Romero Vargas  
e aprovada pela Comissão Julgadora.  
Sergio Marangoni

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

Orientador: Prof. Dr. Sergio Marangoni

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

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

R664c Romero Vargas, Frey Francisco, 1972-  
Caracterização estrutural e funcional da fosfolipase  
A2, BtTX-II, purificada do veneno da serpente *Bothriopsis  
taeniata* / Frey Francisco Romero Vargas. – Campinas, SP:  
[s.n.], 2012.

Orientador: Sergio Marangoni.  
Coorientador: Luís Alberto Ponce Soto.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Bothriopsis taeniata*. 2. Fosfolipase A2. 3.  
Cromatografia de fase reversa. 4. Miotoxina. 5.  
Edema. 6. Veneno – Purificação. I. Marangoni, Sérgio,  
1951-. II. Ponce-Soto, Luís Alberto. III. Universidade  
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Structural and functional characterization of the phospholipase A2,  
BtTX-II, purified of the *Bothriopsis taeniata* snake venom

**Palavras-chave em Inglês:**

*Bothriopsis taeniata*

Phospholipase A2

Reverse-phase chromatography

Miotoxin

Edema

Venom - Purification

**Área de concentração:** Bioquímica

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Sergio Marangoni [Orientador]

Thalita Rocha

Vera Lúcia Bonfim Tiburcio

Gláucia Coelho de Mello

Priscila Randazzo de Moura

**Data da defesa:** 30-03-2012

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

Campinas, 30 de Março de 2012

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Sergio Marangoni (Orientador)

  
Assinatura

Profa. Dra. Thalita Rocha

  
Assinatura

Profa. Dra. Vera Lúcia Bonfim Tiburcio

  
Assinatura

Profa. Dra. Gláucia Coelho de Mello

  
Assinatura

Profa. Dra. Priscila Randazzo de Moura

  
Assinatura

Profa. Dra. Daniela Carla da Silva Damico

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

*Dedico este trabalho ao alicerce de todo ser humano: A família! Pelo apoio, dedicação, incentivo e perseverança, Especialmente:*

*Aos meus pais, Antonio e Martina, que me ensinaram com muito amor a vencer qualquer obstáculo, iluminando sempre os meus caminhos.*

*Meu eterno agradecimento pelo esforço dispensado para minha formação pessoal e profissional.*

*Queridos, vocês sempre serão o meu exemplo de honestidade, coragem e dignidade.*

*Aos meus irmãos Elizabeth e Marco Antonio. Por ser simplesmente a mais alta expressão de amizade incondicional em todo momento.*

*A todos que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e torcendo pelo meu sucesso.*

## AGRADECIMENTOS

*À Deus por sempre iluminar meu caminho, por ter me dado forças, perseverança e determinação para realização deste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Sergio Marangoni pela oportunidade de desenvolver a pesquisa. Obrigado pela paciência e por permitir o acesso ao seu laboratório.*

*Ao Prof. Dr. Luis Ponce-Soto que contribuiu para a conclusão do meu trabalho.*

*A todos os professores do Instituto de Biologia por seus conselhos e amizade durante minha permanência.*

*A Profa Dra Laura Leiva do Departamento de Bioquímica, Faculdade de Ciências Exatas e Naturais e Agrimensura UNNE-Argentina, pela colaboração, atenção e dedicação por me receber em seu laboratório durante o desenvolvimento do estágio. A toda sua equipe: Juan Pablo, Carolina, Silvina e Soledad, à vocês meu agradecimento.*

*À Profa Dra Ofelia Acosta e Pamela Teibler e sua equipe: Silvana e Maria Emilia da Faculdade de Ciências Veterinárias UNNE-Argentina, pela colaboração e acréscimo de sugestões a meu trabalho.*

*À Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni e Maria Alice da Cruz-Höfling pela ajuda e colaboração no desenvolvimento da pesquisa.*

*Aos amigos do laboratório: Victor, Frank, Salomon, Caio, Magaly, Augusto, Desiree, Miriam e Lays pela ajuda e companheirismo, sem contar também com os momentos de descontração e alegria proporcionados por eles. Muito obrigado!*

*Ao Paulo Baldasso (técnico do Laboratório) pelo apoio técnico e amizade e aos que saíram do Laboratorio (LAQUIP), mas me ensinaram e ajudaram muito: Vera e Simone.*

*À UNICAMP, pela oportunidade de crescimento científico e profissional nesta conceituada instituição.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro, proporcionando a realização do meu trabalho.*

*Ao Laboratório Nacional de luz Sincrotron (LNLS), que disponibilizou uso de equipamento multiusuário para a realização deste trabalho.*

*Aos colegas de curso, pela amizade, companheirismo e disposição para dividir comigo, o conhecimento necessário para iniciar e concluir os estudos.*

*A todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente para o bom andamento deste trabalho e que certamente foram indispensáveis.*

*“É possível que tudo possa ser descrito cientificamente, mas não teria sentido. É como se uma sinfonia de Beethoven fosse descrita como uma variação nas pressões de onda (...)  
A mais bela e profunda emoção que se pode experimentar é a sensação do místico.  
Este é o semeador da verdadeira ciência”.*

*Albert Einstein*

*Pedras no caminho? Guardo todas. Um  
dia vou construir um Castelo!*

*Fernando Pessoa*

## Índice

	Pág.
Resumo	xi
Abstract	xiii
I. Introdução	01
1.1. Aspectos gerais e epidemiológicos	01
1.2. Família Viperidae	01
1.3. <i>Bothriopsis taeniata</i>	03
1.4. Fosfolipase A <sub>2</sub>	05
1.4.1. Classificação de enzimas PLA <sub>2</sub> s	06
1.4.2. Mecanismo catalítico das PLA <sub>2</sub> s	09
1.4.3. Especificidade farmacológica de PLA <sub>2</sub> s	11
1.5. Miotoxinas	13
1.5.1. Miotoxinas PLA <sub>2</sub> D49 e K49 de veneno de serpente	14
1.6. Neurotoxinas	17
1.6.1. Neurotoxinas pré-sinápticas	18
1.6.2. Neurotoxinas pós-sinápticas	18
1.7. Regeneração muscular	19
II. Objetivos	21
III. Material e Método	22
3.1. Veneno	23
3.2. Animais	23
3.3. Purificação das toxinas de <i>Bothriopsis taeniata</i>	23
3.3.1. Cromatografia de Exclusão Molecular	23
3.3.2. HPLC de fase reversa	23
3.4. Caracterização bioquímica da BtTX-II	24
3.4.1. Dosagem protéica	24
3.4.2. Eletroforese em SDS-PAGE	24
3.4.3. Determinação da atividade fosfolipásica (PLA <sub>2</sub> )	25
3.4.4. Estudos cinéticos da BtTX-II	25
3.4.4.1. Efeito do pH na atividade PLA <sub>2</sub>	25
3.4.4.2. Efeito da temperatura na atividade PLA <sub>2</sub>	26
3.4.4.3. Efeito da concentração do substrato na atividade PLA <sub>2</sub>	26
3.4.4.4. Efeito inibitório por crotapotinas crotálicas na atividade PLA <sub>2</sub>	26
3.4.4.5. Efeito dos íons na atividade PLA <sub>2</sub>	26
3.4.5. Análise de composição de aminoácidos	26
3.4.6. Análise da proteína por espectrometria de massas	27
3.4.6.1. Determinação da massa molecular da BtTX-II (MALDI Tof MS)	27
3.4.6.2. Caracterização estrutural da BtTX-II por peptídeos trípticos	27
3.5. Caracterização farmacológica da BtTX-II	28
3.5.1. Atividade miotóxica	28
3.5.2. Atividade edematogênica	28
3.5.3. Atividade neurotóxica	29
3.5.3.1. Análise histológica do músculo <i>Biventer cervicis</i> de pintainho	30

3.5.4.	Diferenciação das células da linhagem C2C12	30
3.5.5.	Ensaio de citotoxicidade	31
3.5.6.	Análise histológica da regeneração muscular por microscopia óptica	32
3.6.	Análise estatística	32
IV	Resultados	33
4.1.	Caracterização bioquímica da BtTX-II	33
4.1.1.	Purificação da fração Bt-III a partir do veneno de <i>Bothriopsis taeniata</i> em cromatografia de exclusão molecular	33
4.1.2.	Purificação da BtTX-II a partir da fração Bt-III em um sistema HPLC de fase reversa	34
4.1.3.	Re-cromatografia em HPLC de fase reversa da fração BtTX-II	35
4.1.4.	Tabela de purificação da BtTX-II	36
4.1.5.	Eletroforese em SDS-PAGE da fração BtTX-II	37
4.1.6.	Determinação da atividade PLA <sub>2</sub> (Veneno total, Fração Bt III e BtTX-II)	38
4.2.	Análise estrutural da BtTX-II	39
4.2.1.	Análise da composição de aminoácidos da fração BtTX-II	39
4.2.2.	Determinação de massas moleculares por Espectrometria de Massas (MALDI-TOF MS) da fração BtTX-II	40
4.2.3.	Seqüenciamento de peptídeos trípticos da fração BtTX-II	41
4.2.4.	Determinação do peptídeo contendo o sítio catalítico por espectrometria de massa (MS/MS)	42
4.2.5.	Homologia sequencial dos peptídeos determinados da BtTX-II	43
4.3.	Estudos de atividade cinética da BtTX-II	44
4.4.	Caracterização farmacológica da BtTX-II	47
4.4.1.	Atividade miotóxica local “ <i>in vivo</i> ” da BtTX-II	47
4.4.2.	Atividade miotóxica sistêmica “ <i>in vivo</i> ” da BtTX-II	48
4.4.3.	Análise histológica “ <i>in vivo</i> ” no musculo gastrocnêmio	49
4.4.4.	Atividade edematogênica da BtTX-II	51
4.4.5.	Atividade neurotóxica “ <i>ex vivo</i> ” da BtTX-II	52
4.4.6.	Registros miográficos da fração BtTX-II	53
4.4.7.	Contraturas induzidas por Acetilcolina (ACh) e Potássio (KCl) em preparações <i>Biventer cervicis</i> de pintainho, antes e após a adição da BtTX-II.	55
4.4.8.	Análise histológica quantitativa “ <i>in vitro</i> ”.	56
4.4.9.	Atividade citotóxica através do ensaio coloração cristal violeta da cultura celular com BtTX-II.	59
4.4.10.	Microscopia óptica do ensaio de citotoxicidade da fração BtTX-II.	60
4.4.11.	Perfil de dano e regeneração muscular com BtTX-II.	61
V.	Discussão	63
5.1.	Caracterização bioquímica e estrutural da fração BtTX-II.	63
5.2.	Caracterização farmacológica e morfológica da fração BtTX-II.	68
VI	Conclusão	76
VII	Referências bibliográficas	77
VIII	Anexo	93

### Lista de Abreviações – Cromatografias e Espectrometria.

<b>Sephadex G-75</b>	A dextran-based <i>matrix</i> used for Gel exclusion chromatography
<b>PDA 991</b>	Photodiode Array Detector
<b>HPLC</b>	High (Pressure/Performace) Liquid Chromatography
<b>RP HPLC</b>	Reverse Phase HPLC
<b>C18</b>	18 High Carbon Load, High activity silica
Shim Pack <b>CLC-ODS C18</b>	Coluna Capillary liquid chromatography-octa decyl silane
<b>ESI-MS</b>	Electrospray ionization-Mass spectrometry
<b>TOF</b>	Time of Flight
<b>MALDI-MS</b>	Matrix-assisted laser desorption/ionization–Mass Spectrometry
<b>MS-MS</b>	Tandem Mass Spectrometry

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

TFA	Trifluoroacetic acid
Buffer A	TFA 0,1% used for chromatography of HPLC-FR
Buffer B	Acetonitrile 66% used for chromatography of HPLC-FR
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Tris	Tris(hidroximetil)aminometane
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
4N3OBA	4-nitro-3-octanoyloxybenzoic acid
PAF	Platelet-activating factor
PC	Phosphatidylcholine
PBS	Phosphate buffered saline
TSA	Trypticase Soy Agar
DMEM	Dulbecco`s modification of Eagle`s medium
FBS	Fetal bovine serum

### Lista de Abreviações – fração (isoforma)

PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
BtTX-II	Isoform of PLA <sub>2</sub> from <i>Bothriopsis taeniata</i>
PLC	Phospholipase C
PTC	Phenylthio-carbamyl
SNC	Central Nervous System
SNP	Peripheral Nervous System
CK	Creatin kinase
HE	Hematoxylin-Eosin
PLA <sub>2</sub> D49	Phospholipase A <sub>2</sub> , Aspartate 49, catalytically active.

## Lista de Abreviações – aminoácidos.

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

## RESUMO

Uma nova miotoxina fosfolipase A<sub>2</sub> (BtTX-II) foi purificada a partir do veneno total de *Bothriopsis taeniata* através de dois passos cromatográficos, envolvendo inicialmente cromatografia de exclusão molecular, seguida de HPLC de fase reversa. BtTX-II foi caracterizada bioquimicamente através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostrando uma única banda eletroforética com massa relativa (*Mr*) de 14000 Da, em condições não reduzidas e reduzidas (DTT 1M). A pureza e massa molecular foram confirmadas por espectrometria de massa (MALDI-Tof MS), a qual determinou uma massa molecular de 13889,98 Da. BtTX-II apresentou atividade catalítica de  $12,075 \pm 0,138$  nmoles/mg/min em presença do substrato cromogênico específico ácido 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoico. Análise de composição de aminoácidos da PLA<sub>2</sub> (BtTX-II) corroborou seu caráter básico. A análise dos peptídeos trípticos foi determinada por ESI-QToF-MS/MS espectrometria de massa e as regiões contendo peptídeos internos mostraram semelhança com outras PLA<sub>2</sub>s miotóxicas botrópicas cataliticamente ativas. BtTX-II, pertencente à classe PLA<sub>2</sub> D49, exibiu atividade ótima a pH 8,0 e temperatura de 37 °C. Na ausência de Ca<sup>2+</sup> e na presença de alguns íons divalentes, tais como Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Cd<sup>2+</sup> (10mM), a atividade fosfolipásica foi significativamente diminuída. Também foi demonstrado o efeito inibitório de crotapotinas crotálicas sobre a atividade PLA<sub>2</sub> da BtTX-II.

O efeito neurotóxico da BtTX-II foi analisado através de estudos miográficos em preparações neuromusculares “*ex vivo*”, mostrando que BtTX-II induz um leve bloqueio na junção neuromuscular em preparações *Biventer cervicis* de pintainho. Tais preparações foram utilizadas para o estudo morfológico quantitativo da BtTX-II, o que mostrou uma leve atividade miotóxica “*in vitro*” com a concentração de 50µg de BtTX-II. O efeito miotóxico também foi avaliado através de ensaios de liberação de creatina kinase plasmática e análise histopatológica do músculo gastrocnêmio de camundongo “*in vivo*”, com estes últimos testes foram observados maiores mudanças morfológicas quando comparadas aos estudos “*in vitro*”, mostrando estar diretamente relacionada com a liberação de CK. BtTX-II induz miotoxicidade local após injeção intramuscular, mas não produz miotoxicidade sistêmica após injeções intravenosa. O efeito edematogênico foi estudado através do modelo coxim plantar de camundongo e mostrou ser

elevado nas primeiras horas após injeções subcutâneas, em todas as concentrações aplicadas (1-20 µg). O efeito citotóxico “*in vitro*” foi caracterizado utilizando uma cultura celular da linhagem de mioblastos/miotubos de músculo esquelético de camundongo. BtTX-II não induz citotoxicidade em mioblastos; mas BtTX-II evidenciou atividade citotóxica em miotubos, em uma concentração padrão de 20 µg. Nossos resultados sugerem que BtTX-II atua no processo de regeneração muscular em baixas concentrações (10 µg) durante o período de 28 dias após as injeções intramusculares no gastrocnêmio de camundongo, demonstrando ser apropriado para a análise na regeneração muscular, pois induz necrose e não acarreta lesão do tecido vascular nem nervoso, o que é de suma importância para o processo de regeneração muscular. Isto foi possível pela presença de células satélite envolvidas neste processo junto com o infiltrado inflamatório notório em todos os períodos da regeneração.

## Abstract

A new miotoxin phospholipase A<sub>2</sub> (BtTX-II) was purified from *Bothriopsis taeniata* crude venom through two steps cromatográficos, involving molecular exclusion chromatography, as first step, and followed by RP-HPLC. BtTX-II, was characterized biochemically through electrophoresis in polyacrylamide gel (SDS-PAGE) showing a single eletrophoretic band, in reduced and not reduced conditions, with relative mass (*Mr*) of 14000 Da. The purity and molecular mass was confirmed by mass spectrometry mass (Maldi-Tof SM), showed a molecular mass of 13889.98 Da. BtTX-II showed catalytic activity of  $12.075 \pm 0.138$  nmoles/mg/min upon of the specific chromogenic substrate acid 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoic. Analysis of aminoacid composition of PLA<sub>2</sub> (BtTX-II) corroborated its basic character. Tryptic peptide analyse were determined for ESI-QToF-MS/MS mass spectrometry and the regions containing internal peptides showed similarity with other miotoxic botropics PLA<sub>2</sub>s. BtTX-II belonging to the class PLA<sub>2</sub> D49 exhibited an optimal activity in pH 8.0 and at 37 °C. In the absence of Ca<sup>2+</sup> and in presence of some divalent íons such Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> (10mM), the phospholipasic activity was significantly decreased. Also, it was demonstrated the inhibitory effect of crotalics crotapotins upon activity PLA<sub>2</sub> of the BtTX-II.

The neurotoxic effect of the BtTX-II was analized through myographic studies in neuromuscular preparations “*ex vivo*”, showing that BtTX-II induce a light blockade at the neuromuscular junction on chicken *Biventer cervicis* preparations. Such preparations were used for quantitatives morphologic studies, were shown a light myotoxic activity “*in vitro*” at higher concentration. On the other hand, the myotoxic effect was evaluated through release of plasmatic creatine kinase “*in vivo*” and was carry out histopatologic analyzes mouse gastrocnemius muscle, with these last tests were observed larger morphologic changes when compared to studies “*in vitro*”, showing directly related with the CK liberation. BtTX-II induces local miotoxicity after intramuscular injection, but it did not produce systemic miotoxicity after intravenous injections. The edematogenic effect was studied through the model mouse paw edema and showed to be high in the first hours after subcutaneous injections, in all applied concentrations (1-20 µg). The cytotoxic effect “*in vitro*” was characterized using a cell culture of the rodent lineage of myoblasts/myotubes cells. BtTX-II did not induce citotoxicity in skeletal

muscle myoblasts; however, BtTX-II showed cytotoxic activity in myotubes, both with a standard concentration of 20 µg. Our results suggest that BtTX-II act in the process of muscular regeneration in low concentrations (10 µg) during a period of 28 days after intramuscular injections in the mouse gastrocnemius muscle, This effect was to be appropriate for muscular regeneration analyzes because it induces necroses and it did not carry out lesion of the vascular nor nervous tissue, thus, it is of supreme importance for the process of muscular regeneration. Those results were possible by the presence of satellite cells involved in these processes together with notorious inflammatory infiltrate in every periods of the regeneration.

## I. Introdução

### 1.1. Aspectos gerais e epidemiológicos

Os acidentes causados por serpentes peçonhentas constituem importante problema de Saúde Pública em regiões tropicais do Mundo, especialmente na Ásia, África e América Latina (Arroyo et al., 1999). A incidência e o número de mortes por picada de serpentes, no mundo, são desconhecidos, seja por falta de registro ou por metodologia deficiente na captação de dados (Lizano et al., 2003).

Fontes conservadoras estimam que o número de acidentes ofídicos alcançam 1 milhão, resultando 600.000 envenenamentos e mais de 20.000 mortes anualmente (Chippaux, 1998). Outras fontes colocam incidências anuais globalmente estimadas em 5 milhões, com cerca de 40.000 óbitos (Warrell, 1996; Chippaux e Goyffon, 1998). Neste século o registro mais recente limita-se a informações regionais (Bochner e Struchiner, 2002; Pinho et al., 2004)

Apenas 14% do total de aproximadamente 3000 espécies de serpentes mundialmente distribuídas utilizam a tática de subjugar as presas por envenenamento como principal estratégia alimentar, sendo consideradas venenosas e potencialmente perigosas para o homem (Barraviera e Pereira, 1994; Waldez e Vogt, 2009; Menez et al., 2006).

As serpentes são os répteis de maior sucesso adaptativo, uma vez que elas estão presentes em todos os continentes e todas as áreas de vida, com exceção das áreas polares. Elas estão classificadas no Reino Animalia, Filo Chordata, Classe Reptilia, Ordem Squamata e Subordem Ophidia, existindo diversas famílias. Agrupadas na família Viperidae, os gêneros *Bothrops* (jararaca), *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Crotalus* (cascavel) e *Lachesis* (surucucu); Família Elapidae pelo gênero *Micrurus* (cobra coral) e a Família Colubridae pelos gêneros *Philodryas* (cobra verde) e *Clelia* (cobra preta ou muçurana) (Lira-da-Silva et al., 2009; Butantan, 2001).

### 1.2. Família Viperidae

Os venenos das serpentes que pertencem à família Viperidae têm uma composição química muito complexa, com presença de diversas toxinas e enzimas que afetam múltiplos processos fisiológicos (Rojas et al., 2001). A família Viperidae (Viperídeos) é a mais extensa das serpentes venenosas e têm tendência a ser mais pesada e volumosa que as da Elápidae; muitas delas são notadamente lentas (Chaves et al., 1996). Os Viperídeos incluem aproximadamente 270 espécies distribuídas pelo mundo (Mallow et al., 2003) e elas são caracterizados pela posse do aparato de veneno mais sofisticado entre todas as serpentes, consistindo de dois dentes

inoculadores retrácteis posicionados na parte anterior do maxilar superior móvel, eles são projetados para fora durante o ataque, dentição solenóglifa. Este mecanismo permitiu nos Viperídeos para evoluir os dentes inoculadores particularmente longos e representa o sistema de entrega de veneno mais sofisticado conhecido em serpentes, que é associado com a história de vida deles como predadores de emboscada predominantemente sedentários que alimentam de presa relativamente grande (Greene, 1992; Wüster et al., 2008), estas serpentes são facilmente identificadas pela cabeça triangular, recoberta por pequenas escamas de aspecto similar às do corpo, além da presença de fosseta loreal entre os olhos e a narina.

A subfamília mais importante é Crotalinae, chamada de serpentes de fosseta ‘pit viper’, que possuem a forma característica de fosseta térmica, formadas principalmente por vários gêneros venenosos estendidos pelas Américas e algumas espécies na Ásia. Atualmente, são conhecidos 18 gêneros. No Novo Mundo temos uma maior diversidade, com a presença de 11 gêneros, quando comparado com o Velho Mundo, onde temos a presença de 7 gêneros (Chaves et al., 1996; McDiarmid et al., 1999).

Os Viperídeos representam o mais importante grupo de serpentes para a Saúde Pública, pois são responsáveis pela enorme maioria e pelos mais graves acidentes ofídicos registrados, não só no Brasil, mas também em outros países americanos. Os envenenamentos provocados por estas serpentes são caracterizados pelos seus efeitos locais e sistêmicos (Gutiérrez et al., 2005; White, 2005), que acometem tanto a região da picada, quanto os tecidos e órgãos afastados do local da picada; tais efeitos se manifestarão ao final de 2-3 horas, através de coagulopatias, choque cardiovascular e insuficiência renal (Rojas et al., 2001; França e Málaque, 2003).

Recentemente têm sido reclassificados os gêneros sul-americanos desta subfamília de Viperídeos em *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Porthidium*, *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (de Carvalho et al., 2007). São quatro grupos de serpentes que podem causar acidentes ofídicos no Brasil: Grupo I (Gêneros *Bothrops*, *Bothriopsis* e *Bothrocophias*; conhecidas popularmente como jararacas, caissaca, urutú-cruzeiro, jararacussu); Grupo II (Gênero *Crotalus*; conhecidas popularmente como cascavéis); Grupo III (Gênero *Lachesis*; conhecidas popularmente como surucucu-bico-de-jaca) e Grupo IV (Gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus*; conhecidas popularmente como corais-verdadeiras) (Melgarejo, 2003).

### 1.3. *Bothriopsis taeniata*

*Bothriopsis* (“pitvipers”) é um gênero de serpentes venenosas que está incluído no grupo *Bothrops* (Grazziotin e Echeverrigaray, 2005). O nome científico dele é derivado das palavras gregas *bothros* (“foseta”) e *-opsis* (“face” ou “aparecimento”), uma insinuação para as fossetas loreais, é considerado um grupo recente e relativamente especializado em alguns aspectos biológicos.

Em humanos, denomina-se “acidente botrópico” o causado por qualquer um das espécies do grupo *Bothrops*. Tais acidentes botrópicos são mais frequentes do que os crotálicos (Cascaveis); laquésicos, determinados pela picada de *Lachesis muta* (Surucutinga, Surucucu-de-fogo, Surucucu-pico-de-jaca) e elapídicos, os causados por serpentes do gênero *Micrurus* (Corais verdadeiras), que são bem menos comuns (Borges, 1999, Barraviera e Pereira, 1994).

As espécies do gênero *Bothriopsis* possuem cauda preênsil com mais de 70 escamas subcaudais (conseguem subir nas copas das árvores); espécies subarborícolas com dieta generalista (Fenwick et al., 2009). Alimentam-se principalmente de roedores e anuros, e também de serpentes e lagartos; também mencionaram pequenos pássaros encontrados no conteúdo estomacal dessa espécie (Turci et al., 2009) e habitam as florestas tropicais do Norte da América do Sul, particularmente nos países andinos. Há seis espécies na América do Sul do gênero *Bothriopsis* (família *Viperidae*), e no Brasil ocorrem duas espécies: *Bothriopsis bilineata* e *Bothriopsis taeniata* (Lira-da-Silva et al., 2009).

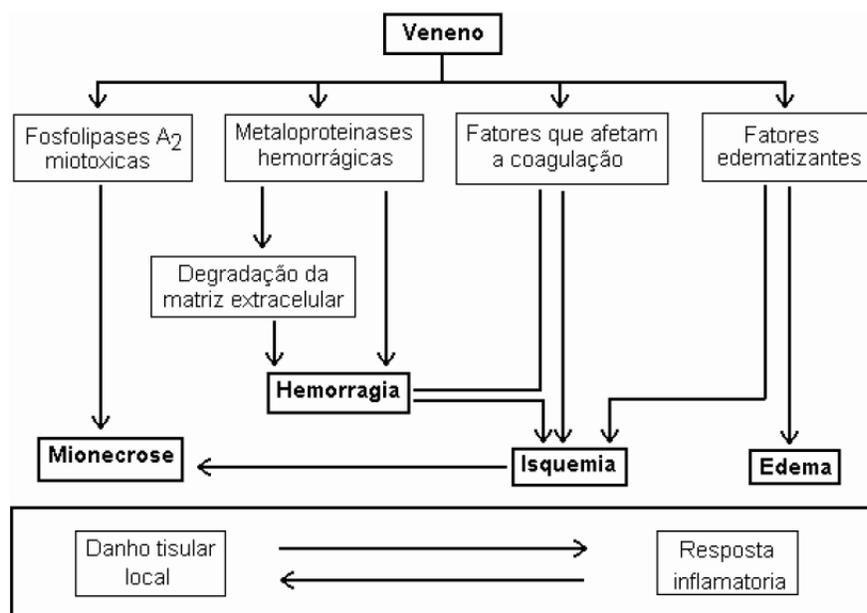


**Figura 1.** A serpente *Bothriopsis taeniata* (Speckled forest pit viper) (Foto de [www.flickr.com/photos](http://www.flickr.com/photos)).

Serpentes geralmente conhecidas como víboras de fossetas da floresta (Forest pit vipers) são excepcionalmente longas e variam em tamanho (Campbell e Lamar, 2004). Têm sido descritas como semi-arbóreas, mas também são predominantemente terrestres (Cunha e Nascimento, 1978; Campbell e Lamar, 2004). *Bothriopsis taeniata* é uma víbora rara no Brasil (Santos, 2003) e quase nunca é encontrada. Isto ocorre devido à semelhança da coloração de corpo, que imita as folhas e líquens do chão da floresta (Melgarejo, 2003). Tem sido reportado um caso autêntico de uma picada desta serpente conhecida também como jararaca estrela (Torrez et al., 2009) ou jararaca tigrina (Miranda-Silva, 2009) (Figura 1).

Recentemente, houve uma conscientização crescente entre muitos investigadores que uma base taxonômica é essencial para a pesquisa toxinológica e pode ser de vital importância para a formulação de estratégias no tratamento de antiveneno para pacientes envenenados (Golay et al., 1993; Wüster e Harvey, 1996).

Os venenos das serpentes atuam sob diferentes mecanismos em nosso organismo, assim de acordo com sua ação, podemos classificá-los em: Proteolítico, Coagulante, Neurotóxico, Hemorrágico, Miotóxico e Nefrotóxico (Arcolini, 2006). A ação proteolítica no local da picada, possivelmente, decorre da atividade de proteases, hialuronidasas e fosfolipases, da liberação de mediadores da resposta inflamatória, da ação das hemorraginas sobre o endotélio vascular e da ação pró-coagulante do veneno (FUNASA, 2001).

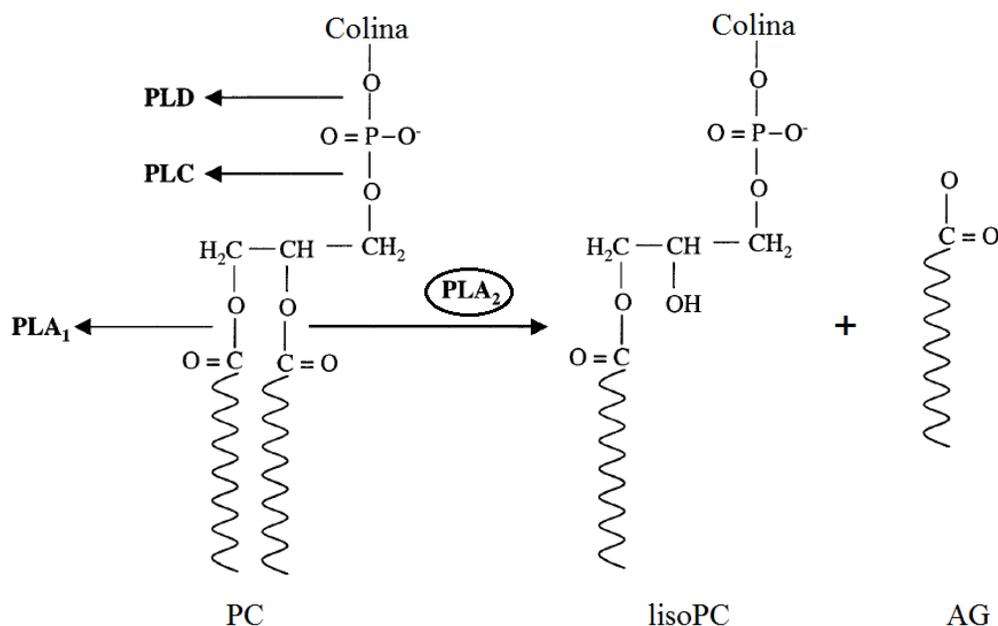


**Esquema 1.** Hipóteses sobre o desenvolvimento dos efeitos locais induzidos por venenos das serpentes da família Viperidae (Adaptado de Gutiérrez, J.M. e Lomonte, B. 2003).

A manifestação sintomática no envenenamento é caracterizada por dor e edema local de intensidade variável, gengivorragia, epistaxe e hematúria, equimoses; bolhas e necrose podem aparecer em dias sucessivos, com ou sem alteração do tempo de coagulação (Arcolini, 2006). As manifestações hemorrágicas são decorrentes da ação das hemorraginas que provocam lesões na membrana basal dos capilares, associadas à trombocitopenia e alterações da coagulação (Marques et al, 2003). O esquema 1 sintetiza o que foi exposto. Mas indiscutivelmente ainda há uma série de incógnitas com relação à patogênese destes efeitos, que ainda permanecem como um desafio para a pesquisa toxicológica na América Latina (Gutiérrez e Lomonte, 2003).

#### 1.4. Fosfolipase A<sub>2</sub>

Fosfolipases são enzimas esterolíticas que hidrolisam glicerofosfolídeos. Baseado em seu modo de ação, elas são classificadas em quatro diferentes grupos, denominados A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>), A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), C (PLC) e D (PLD) de acordo com o local de hidrólise no substrato (Wang, 2001) (Figura 2).



**Figura 2.** Sítios de atuação das fosfolipases e hidrólise de fosfatidilcolina por PLA<sub>2</sub> e os produtos da reação. Note que a seta PLA<sub>2</sub> indica o local de hidrólise, e seus produtos da reação final. PC, Fosfatidilcolina; AG, ácido graxo e lisoPC, lisofosfatidilcolina (Modificado de Wang 2001).

Os venenos de serpentes contêm um grande número de proteínas bioativas, entre elas a fosfolipase A<sub>2</sub> (EC 3.1.1.4), dependente de cálcio, que catalisa a hidrólise de 1,2-diacil-3-*sn*-glicerol dos fosfoglicerídeos. Esta reação libera quantidades equimolares de ácido graxo da posição *sn*-2 e o lisofosfatídeo (Arni e Ward, 1996; Kini, 2003; Pirolla et al., 2011).

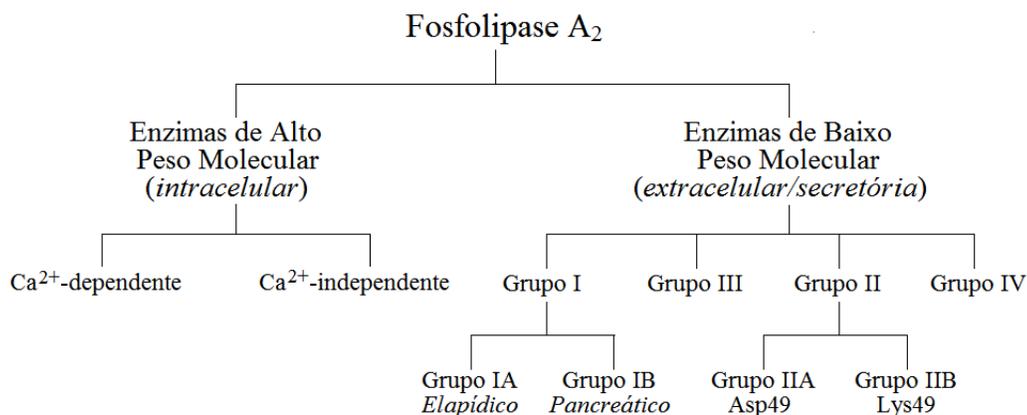
Fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol e ácido fosfatídico são os substratos de PLA<sub>2</sub>s mais comuns que conduzem à formação de lisofosfolídeos diferentes (Cisne de Paula et al., 2009).

PLA<sub>2</sub>s participam de uma ampla variedade de processos fisiológicos, incluindo digestão de fosfolídeos, remodelamento de membrana celular e defesa do hospede, e também toma parte em processos fisiopatológicos produzindo precursores de vários tipos de mediadores lipídicos biologicamente ativos, tais como: prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e fator ativante de plaquetas (PAF) (Arita et al., 1989). PLA<sub>2</sub>s são enzimas amplamente distribuídas na natureza e são as mais estudadas entre todas as fosfolipases (Kini, 1997; Ponce-Soto et al., 2006; Zhang et al., 2007).

#### 1.4.1. Classificação de enzimas PLA<sub>2</sub>s

Existem várias formas de se classificarem as PLA<sub>2</sub>s, de acordo com suas características bioquímicas, como localização celular (intracelular e extracelular), requerimento de Ca<sup>2+</sup> (dependentes e independentes de Ca<sup>2+</sup>), especificidade de substrato e a estrutura primária. Estas PLA<sub>2</sub>s são classificadas em várias famílias (Davidson e Dennis, 1990).

Inicialmente, as PLA<sub>2</sub>s foram classificadas em dois grupos, que foram originalmente usados em 1977 para distinguir entre venenos das famílias Elapidae (cobras, najas, kraits, mambas e serpentes corais) e Hydrophyidae (serpentes do mar), ambas pertencentes ao grupo I, e da família Viperidae (surucucus, cascavéis e jararacas), pertencente ao grupo II, baseado no número de pontes bissulfeto (Heinrikson et al., 1977).



**Figura 3:** Classificação de enzimas PLA<sub>2</sub>s (Adaptado de Kini, 1997)

Diversas PLA<sub>2</sub>s têm sido descobertas em secreções (sPLA<sub>2</sub>, secretórias ou extracelulares) e no citosol (cPLA<sub>2</sub> ou intracelulares), assim como enzimas de alto (61-114 kDa) e baixo peso molecular (13-18 kDa). De acordo com Kini (1997), as PLA<sub>2</sub>s de baixo peso molecular podem ser subdivididas em quatro grupos (I, II, III e IV) pela sua estrutura primária (Figura 3). As PLA<sub>2</sub>s intracelulares apresentam alta massa molecular (85 kDa), geralmente estão associadas as membranas, são cálcio-dependentes e estão envolvidas no metabolismo de fosfolipídios (perturbações das membranas), na sinalização celular e no remodelamento de fosfolipídios PLA<sub>2</sub> (Arni e Ward, 1996; Six e Dennis, 2000).

Atualmente, a superfamília das PLA<sub>2</sub>s é composta por 15 grupos que, a despeito de suas distribuições e ocorrências variadas, caracterizam-se por apresentarem similaridade sequencial e estrutural, diferenciando-se somente pela localização e quantidade de pontes dissulfeto e pelo comprimento de seus loops. Por todas estas características, Burke e Dennis (2009) as classificam em cinco tipos principais de PLA<sub>2</sub>s: sPLA<sub>2</sub> secretória, cPLA<sub>2</sub> citosólica, iPLA<sub>2</sub> independente de Ca<sup>2+</sup>, acetilhidrolases de PAF e PLA<sub>2</sub> lisossomal.

As PLA<sub>2</sub>s de veneno de serpentes (sPLA<sub>2</sub>s) são proteínas secretadas pertencentes aos grupos I e II. As do grupo I são encontradas em venenos de serpentes da família Elapidae (Elapinae e Hydrophiinae) e tecidos pancreáticos de mamíferos, enquanto que as do grupo II são subdivididas em sete subgrupos (IIA-IIIF), sendo que o subgrupo IIA engloba as PLA<sub>2</sub>s encontradas nos venenos de serpentes da família Viperidae (Viperinae e Crotalinae) e em tecidos não pancreáticos de mamíferos (Six e Dennis, 2000; Burke e Dennis, 2009). Devido ao constante avanço de técnicas de sequenciamento de aminoácidos e caracterização estrutural, novas PLA<sub>2</sub>s foram e continuam sendo descobertas, necessitando-se de constante revisão bibliográfica para atualização de seus grupos e subgrupos.

sPLA<sub>2</sub>s de baixa massa molecular (13-18 kDa) têm várias características distintas de outras famílias de PLA<sub>2</sub>, como um conteúdo alto de pontes bissulfeto, um requerimento de concentrações milimolares de cálcio para catálise e uma especificidade ampla para fosfolipídeos com diferentes grupos de cabeça polar e cadeias de ácidos graxos. Além das funções enzimáticas, elas podem mostrar várias funções biológicas (Mukheerjee et al., 1994), como as sPLA<sub>2</sub> de mamífero, que fazem um papel importante em fertilização (Fry et al., 1992), proliferação celular (Nakajima et al., 1992; Sommers et al., 1992), hiper-sensibilização e doenças inflamatórias crônicas (Vadas e Pruzanski, 1986; Vadas et al., 1993). Porém, enzimas de mamífero geralmente são não tóxicas e falham para induzir efeitos farmacológicos potentes. Por outro lado, enzimas

PLA<sub>2</sub>s de veneno de serpente, além do possível papel na imobilização e captura da presa, também participa na digestão da presa e exibem efeitos tóxicos (Kini, 2003).

Venenos de serpente do Grupo I (Elapidae and Hydrophidae) e do grupo II (Crotalidae and Viperidae) são uma fonte abundante de enzimas PLA<sub>2</sub>s e apresentam semelhança em suas estruturas primárias e secundárias em relação às de mamíferos. As PLA<sub>2</sub>s estão entre as proteínas tóxicas principais do veneno, exibindo um grande espectro de efeitos farmacológicos, interferindo em processos fisiológicos normais da presa ou vítimas (Kini, 1997 e 2005; Schaloske e Dennis, 2006), como neurotoxicidade (pré ou pós-sináptica), miotoxicidade (mionecrose local ou sistêmica), cardiotoxicidade, ativação e/ou inibição da agregação plaquetária, anticoagulação, edema, convulsão, hipotensão, hemorragia interna, dentre outras, porém, nem todas as PLA<sub>2</sub>s induzem todos esses efeitos.

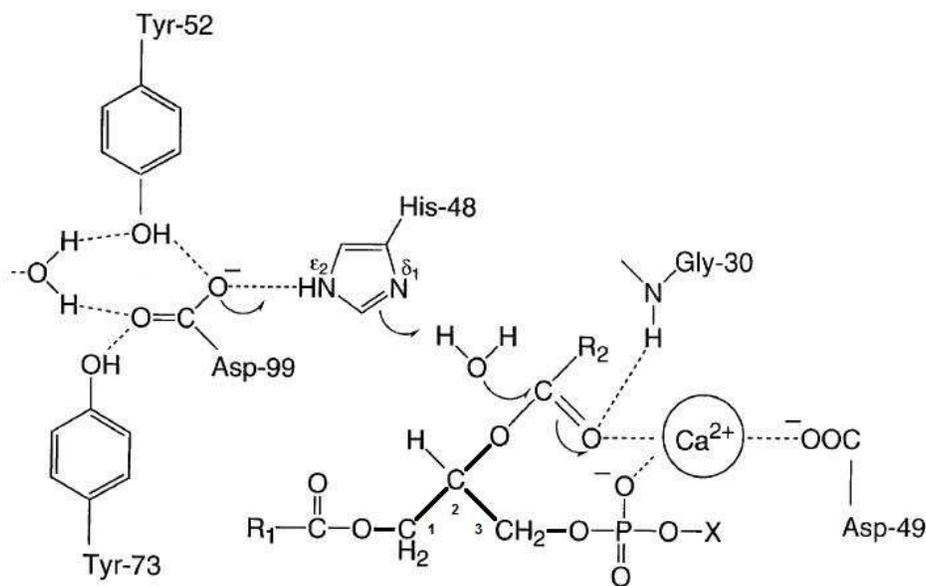
PLA<sub>2</sub>s de veneno de serpente tipicamente existem como monômeros e às vezes como complexos formados entre enzimas PLA<sub>2</sub>, como também com outras proteínas, por interações covalentes ou não covalentes. Frequentemente, um único veneno de serpente contém várias isoenzimas PLA<sub>2</sub> e, às vezes, diferentes isoenzimas induzem efeitos farmacológicos distintos. A presença de múltiplas isoformas de uma proteína evidencia a ocorrência de duplicações gênicas e a grande diversidade estrutural e funcional em cada família multigênica de proteínas indica a ação de uma evolução acelerada das toxinas (Kordis et al., 2002; Ohno et al., 2002).

Usualmente, as PLA<sub>2</sub>s do grupo IIA são também subdivididas em dois grandes subgrupos principais: as PLA<sub>2</sub>s D49, assim denominadas por possuírem um resíduo de aspartato na posição 49 e são cataliticamente ativas, e as PLA<sub>2</sub>s K49, nas quais o resíduo de aspartato é substituído por um resíduo de lisina na mesma posição, que tem baixa ou nenhuma atividade catalítica (de Araujo et al., 1996), sendo ambas biologicamente ativas (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Arni e Ward, 1996). Além da atividade enzimática, as PLA<sub>2</sub>s de veneno pode ter atividades neurotóxicas, miotóxicas, hemolíticas, anticoagulantes, cardiotóxicas e edematogênicas, como também agregante plaquetária ou antiagregante plaquetária (Arni e Ward, 1996; Kini, 2004; Kini, 2005; Ohno et al., 2003), sendo assim uma molécula multifuncional.

### 1.4.2. Mecanismo catalítico das PLA<sub>2</sub>s

A presença de um íon cálcio divalente ( $\text{Ca}^{2+}$ ) é um cofator essencial para a ligação do substrato no sítio catalítico e para o processo enzimático das fosfolipases A<sub>2</sub> (Berg et al., 2001). O mecanismo atualmente aceito para a ação catalítica de PLA<sub>2</sub> foi originalmente proposto por Scott et al. (1990) sendo posteriormente revisado por Kini et al. (2003).

A unidade catalítica das PLA<sub>2</sub> é constituída pelos resíduos de aminoácido His-48 (posição 48 da cadeia polipeptídica), Asp-99 e uma molécula de água (Figura 4). No mecanismo de catálise proposto, o próton na posição 3 do anel imidazólico da His-48 está envolvido em uma forte interação com o grupo carboxilato do Asp-99, impedindo que ocorra rotação do anel imidazólico, deixando o nitrogênio na posição 1 deste anel (que está envolvido na catálise) em posição espacial apropriada. Uma molécula de água promove então o ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do substrato e, nesse momento, o anel imidazólico da His-48 recebe um próton da molécula de água, facilitando a reação (Berg et al., 2001).



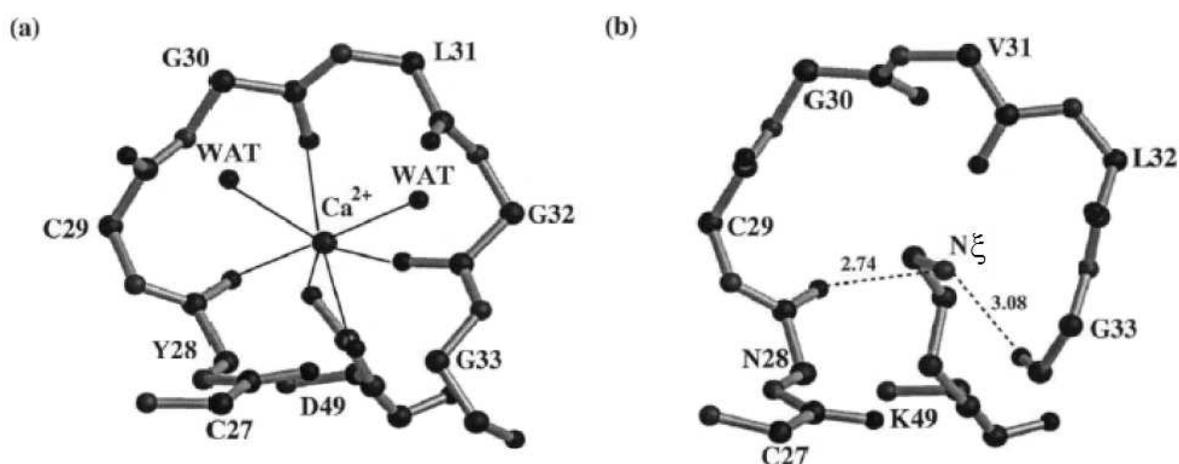
**Figura 4.** Representação esquemática do mecanismo catalítico das PLA<sub>2</sub>s (Adaptado de Janssen et al., 1999).

Após a hidrólise da ligação acil-éster na posição *sn*-2 do fosfoglicerídeo (substrato), este próton é doado pelo anel imidazólico para o oxigênio, que forma então o grupo álcool do lisofosfolipídeo a ser liberado (Verheij et al., 1980a, b). O mecanismo catalítico das PLA<sub>2</sub>s de baixo peso molecular (14 kDa) envolve resíduos que participam da alça de ligação para íons  $\text{Ca}^{2+}$  nas PLA<sub>2</sub> clássicas, que são Tyr-28 (posição 28 na cadeia polipeptídica), Gly-30, Gly-32 e Asp-

49. No mecanismo de catálise, o cálcio tem dupla função: fixação do grupamento fosfato do fosfolípido e estabilização da carga negativa do oxigênio do grupo carbonil da ligação éster da posição *sn*-2 do substrato (Yang, 1994, 1997). A amida NH da Gly-30 também foi sugerida como um fator importante na estabilização do estado de transição (Verheij et al., 1980b).

Por último, depois da protonação do lisofosfolípido formado, juntamente com a desprotonação do nitrogênio  $\delta_1$  da histidina. Observa-se que neste ponto, o sítio catalítico é regenerado às condições iniciais e ocorre a formação de produtos não ionizados, liberados na sequência de reações (Janssen et al., 1999).

Como anteriormente mencionado, o resíduo de ácido aspártico na posição 49 das PLA<sub>2</sub>s é essencial para a coordenação do íon  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo responsável, conjuntamente com outros aminoácidos, pela fixação do substrato ao sítio enzimático e conseqüentemente pela atividade catalítica exercida por estas enzimas (Figura 5a). No entanto, a substituição natural da Asp49 por uma lisina impede a coordenação deste íon (Scott et al., 1990) e, ainda, o N $\xi$  da cadeia lateral da Lys49 ocupa a posição do íon  $\text{Ca}^{2+}$ , inviabilizando a ocorrência da reação catalítica (Lee et al., 2001) (Figura 5b).



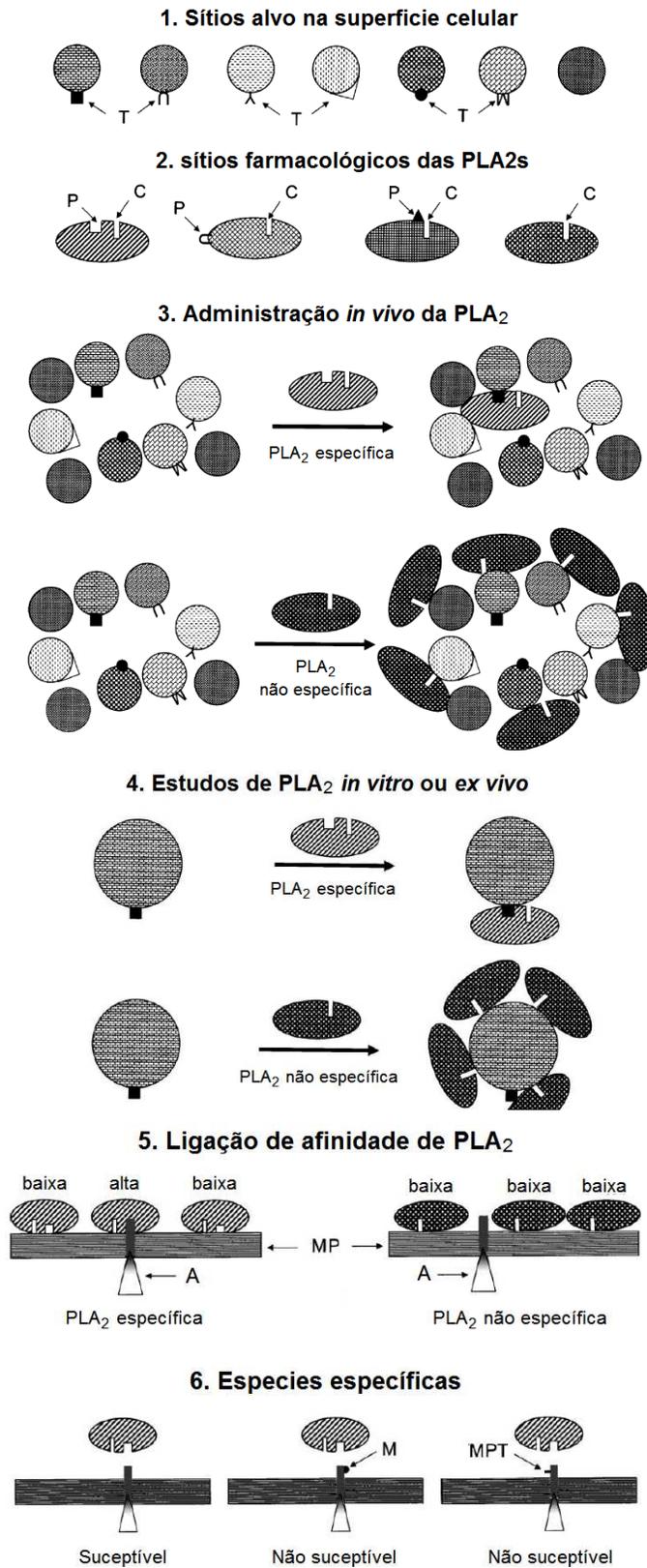
**Figura 5:** Figura ilustrativa dos resíduos do sítio catalítico de PLA<sub>2</sub> D49 que possibilita coordenação do  $\text{Ca}^{2+}$  e região análoga das PLA<sub>2</sub> K49. (a). Loop de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  de uma PLA<sub>2</sub> D49 de *Naja naja naja*. (b). Região análoga à região de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  da BaspTX-II (PLA<sub>2</sub> K49) do veneno de *Bothrops asper*. WAT: molécula de água (Adaptado de Ward et al., 1998).

As PLA<sub>2</sub>s K49 são consideradas PLA<sub>2</sub>s homólogas por não possuírem atividade catalítica detectável frente a substratos lipídicos. São proteínas básicas e hidrofóbicas com elevada atividade miotóxica tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Liu et al., 1990; Francis et al., 1991; Dennis, 1994; Gutiérrez e Lomonte, 1997; Ward et al., 1998).

### 1.4.3. Especificidade farmacológica de PLA<sub>2</sub>s

Segundo Kini (2003), as PLA<sub>2</sub> procedentes de veneno de serpentes compartilham uma similaridade em estrutura e função com as enzimas de mamífero. Propõe-se que as PLA<sub>2</sub> procedentes de veneno de serpentes possuam uma habilidade de se unir a um “sítio específico” das membranas celulares alvo, devido à sua alta afinidade de se ligar a proteínas específicas que atuam como receptores ou aceptores. Essa ligação específica de PLA<sub>2</sub> se dispõe pela presença de um sítio “farmacológico” em sua superfície, que é independente do sítio catalítico. A interação da alta afinidade da PLA<sub>2</sub> com seu receptor (proteína alvo) deve-se provavelmente à complementaridade de carga, hidrofobicidade e forças de Van der Waals, que se dá entre o sítio farmacológico da PLA<sub>2</sub> e o sítio alvo na superfície do receptor proteico ou receptor na membrana celular. A PLA<sub>2</sub> pode induzir seus efeitos farmacológicos por mecanismos dependentes ou independentes de sua atividade enzimática. Desta forma o esquema 2 representa a hipótese apresentada por Kini (2003):

- 1 – A célula alvo difere de uma célula não alvo (extremo direito), pela presença de sítios alvos (A) distintos na superfície da célula, que podem ser uma proteína ou glicoproteína transmembrana.
- 2 – Temos o sítio complementar ao sítio alvo; o sítio farmacológico (F) está presente na PLA<sub>2</sub> específica, além do sítio catalítico (C). Uma PLA<sub>2</sub> não específica (extremo direito) não possui o sítio farmacológico (F). A natureza e a localização dos sítios farmacológicos na superfície molecular das PLA<sub>2</sub> variam com a enzima.
- 3 – Quando se administra a PLA<sub>2</sub>, por meio da via intraperitoneal ou intravenosa, as PLA<sub>2</sub> específicas procuram e se ligam às células alvo, devido à sua afinidade alta pelo sítio alvo. De outro lado, uma PLA<sub>2</sub> não específica vai se ligar a muitos tipos diferentes de células. As PLA<sub>2</sub> não específicas, assim, não vão lesar a célula alvo eficazmente como a PLA<sub>2</sub> específica.
- 4 – Um sistema *in vitro* ou *ex vivo*, como por exemplo, célula, tecido ou órgão incubado com as PLA<sub>2</sub>s. As PLA<sub>2</sub>s específicas e não específicas podem lesar a célula alvo e poderiam exibir “efeitos farmacológicos”. Isto é particularmente verdade quando a atividade enzimática desempenha um papel maior, induzindo o efeito farmacológico, embora sejam necessárias quantidades mais altas de enzimas não específicas para induzirem os efeitos similares das PLA<sub>2</sub> específica.



**Esquema 2.** Modelo para explicar os efeitos farmacológicos das PLA<sub>2</sub>s. (Adaptado de Kini, 2003).

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

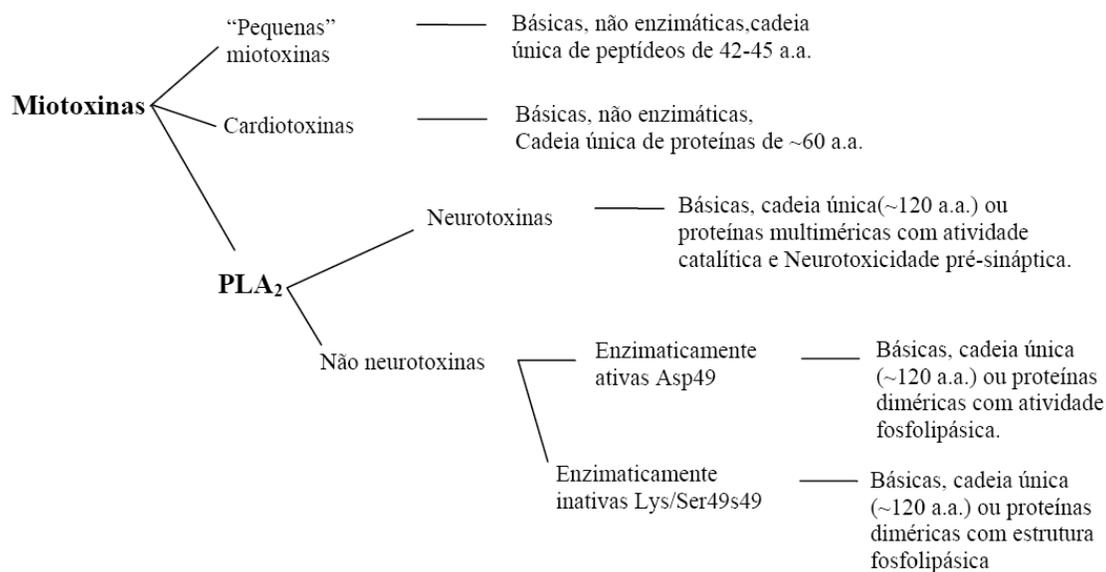
6 – Vemos que o sítio alvo é um “bom encaixe” para o sítio farmacológico em espécies de células ou tecidos suscetíveis. Nas espécies não suscetíveis, aquelas que têm sofrido processos de mutações (M) ou modificações pós traducionais (MPT), como glicosilações, células ou tecidos suscetíveis, são suficientes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

### **1.5. Miotoxinas**

As miotoxinas são particularmente abundantes e amplamente distribuídas nos venenos de serpentes, ou de outros organismos. São geralmente definidas como componentes naturais (proteínas pequenas e peptídeos) das secreções venenosas que podem agir localmente, danificando as fibras musculares irreversivelmente (mionecrose) no local da picada e ao redor. Entretanto outras miotoxinas agem sistematicamente, causando dano muscular em sítios distantes. A mionecrose é considerada uma importante complicação médica da picada da serpente, podendo provocar sequelas drásticas, como perda de tecido até amputação (Otero et al., 2002; Gutierrez e Ownby, 2003; Lomonte et al., 2003). Por outro lado, a miotoxicidade sistêmica pode provocar mioglobinúria e insuficiência renal severa, uma causa frequente de morte por picada de serpente (Azevedo-Marques et al., 1985).

As miotoxinas até então descritas nos venenos de serpente podem ser classificadas em três principais grupos (Harris e Cullen, 1990): (1) as miotoxinas 'pequenas' (p. ex. crotamina de *Crotalus durissus terrificus*, miotoxina A de *Crotalus viridis viridis*), (2) as cardiotoxinas, e (3) as miotoxinas PLA<sub>2</sub> (Figura 6). As miotoxinas PLA<sub>2</sub> formam o maior grupo que pode ser mais adiante categorizado em tipos neurotóxicos e não-neurotóxicos (Mebs e Ownby, 1990). Entre o último, uma divisão clara entre miotoxinas 'Asp49' e 'Lys49' existe, como mais adiante será detalhado. Um quarto grupo de proteínas miotóxicas tem sido considerado (Gutiérrez e Cerdas,

1984), incluindo uma variedade de componentes de veneno que podem danificar o músculo esquelético através de mecanismos indiretos, como as toxinas hemorrágicas que causam prejuízo de fluxo de sangue local, isquemia e mionecrose secundária de início lento. Porém, o componente mais importante e abundante prejudicial para o músculo em venenos animais são fosfolipases A<sub>2</sub>.



**Figura 6.** Classificação e características gerais de miotoxinas de veneno de serpente (Adaptado de Lomonte et al., 2003).

### 1.5.1. Miotoxinas PLA<sub>2</sub> D49 e K49 de veneno de serpente

As miotoxinas PLA<sub>2</sub> de venenos de serpente possuem uma região catalítica conservada formada principalmente por quatro resíduos de aminoácido His48, Asp49, Tyr52, e Asp99 (Arni e Ward, 1996). Juntamente com resíduos da região (ou *loop*) de união para cálcio, o aminoácido Asp49 coordena o cofator essencial de íon Ca<sup>2+</sup> para hidrólise de fosfolipídeos (Scott et al., 1990). Desta forma, a presença de Asp49 e a capacidade de se ligar ao Ca<sup>2+</sup> são consideradas como um requerimento absoluto para a expressão da atividade catalítica em todas as PLA<sub>2</sub>s secretórias.

Em geral, miotoxinas PLA<sub>2</sub> são proteínas básicas (Gutiérrez e Lomonte, 1997; Moura-da-Silva, et al., 1991) e em alguns casos as PLA<sub>2</sub>s K49 são mais miotóxicas que as PLA<sub>2</sub> D49, ambas provenientes da fonte de veneno de serpente (Selistre de Araujo et al., 1996; Ownby et al., 1999). Este tipo de proteínas semelhantes está presente em várias espécies de serpentes Viperidae, principalmente da subfamília Crotalinae (Lomonte et al., 2003). Devido à diferença

essencial delas com as verdadeiras enzimas PLA<sub>2</sub>, as proteínas Lys49 substituídas geralmente foram chamadas "PLA<sub>2</sub>-like", ou "PLA<sub>2</sub> homólogas" (Lomonte et al., 2009).

O tipo mais frequente de toxinas apresenta a substituição de Lys, mas outros aminoácidos, como Ser (Krizaj et al., 1991; Polgár et al., 1996), Arg (Mebs et al., 2006; Wei et al., 2006; Murakami et al., 2008), Gln (Bao et al., 2005), e Asn (Pan et al., 1998) também foram achados nesta posição. A maior parte da estrutura primária das PLA<sub>2</sub>s de veneno de serpente é conservado em grupos e participa na atividade catalítica ou ocupa posições fundamentais (Figura 7). A estrutura secundária destas fosfolipases de veneno de serpente também é preservada estritamente, como também a estrutura tridimensional que inclui uma  $\alpha$ -hélice N-terminal, uma asa de união para Ca<sup>2+</sup>, duas longas  $\alpha$ -hélices antiparalelas, duas curtas  $\beta$ -folhas antiparalelas e uma região C-terminal (Ohno et al., 2003).

**A**

	1	10	20	+ + 30 ●	40	++	●●●●●	+ 60	70 ●	80+	+ 90 + ●	100 +	110	120 +	+				
K49agk.pro	SLFELGKMI	WQETGKNPVKNYGL	- YGCNCGV	GGRGEP	LDA	TDRCCF	VHKCCYK	- - -	KLTDCD	- - - -	SKKDRYSY	KWNKAI	VCGKNG	- PCMGEMCE	GDKAFI	CLRENLD	TYNKSF	RYHLKPS	- CKKTSEOC
K49mio.pro	SLFELGKMI	LOETGKNPAKSYGV	- YGCNCGV	GGRGKPKDA	TDRCCY	VHKCCYK	- - -	KLTGCD	- - - -	PKKDRYSY	SMKDKTI	VCGENN	- SCLKEL	CECDKA	VAI	CLRENLD	TYNKRY	NYLKP	- CKKADP
K49bot.pro	SMYQLWKMI	LOETGKNAPVSYGL	- YGCNCGV	GGSRGKPKDA	TDRCCF	VHKCCYK	- - -	KLTDCS	- - - -	PKTDSYSY	SMKDKTI	VCGDNN	- PCLCEM	CECDKA	VAVI	CLRENLD	TYNKRY	NYLKP	- CKKADP
S49eca.pro	SVVELGKMI	LOETGKSPFYSYI	- YGCFGG	GERPPLDA	TDRCCLA	HSCCYD	- - -	TLFDCS	- - - -	PKTDRYKY	KRENGEI	I	CENST	- SKKRI	CECDKA	VAVI	CLRENLD	TYNKRY	NYLKP
D49vip.pro	NLFQFGDMI	LOETGKEAVHSYAI	- YGCYCG	WGGQGR	QDA	TDRCCFA	QDCCYG	- - -	RVNDCN	- - - -	PKTATY	TSKNGD	VV	CGDD	- LCLR	AV	CLRENLD	TYNKRY	NYLKP
D49bjs.pro	SLWQFGKMI	NVVMGESVLYLS	- YGCYCG	GLGGQGP	TDAT	DRCCFV	HDCCYG	- - -	KVTGCN	- - - -	PKI	DSY	TSKNGD	VV	CGDD	- LCLR	AV	CLRENLD	TYNKRY
D49fns.pro	SLLFEGKMI	LEETGKLAIPSYSS	- YGCYCG	WGGKGT	PKDA	TDRCCF	VHDCCYG	- - -	NLPDCN	- - - -	PKSDRY	KYKRY	NGAI	VCEKGT	-	SCENRI	CECDKA	VAVI	CLRENLD
D49ntx.pro	NLVQFSYLI	QCANHGRKPTWHYMDY	GYCYCG	AGSGS	TPVDEL	DRCCKI	HDDCYDEAGKK	- GCF	- - - - -	PKMSA	VDYY	CGENGP	CRNI	KKKCL	RFV	CGDVEA	AF	CF	AKAPY
D49oph.pro	HLIQFGNMI	QCTVPGFLSMIKYADY	GCYCG	AGSGS	GTPVDK	LDRCCGV	HDCNCT	GAQKLP	ACSS	I	MDS	PPV	KI	YS	DCS	ERT	V	T	CKA



**Figura 7.** Comparação de estruturas entre Lys/Asp/Ser49 PLA<sub>2</sub>s. (A) alinhamento de estrutura primária incluindo Lys49-PLA<sub>2</sub>s de *Agkistrodon acutus* (K49agk), *Bothrops godmani* (K49bot), *B. moojeni* (K49mio), Ser49-PLA<sub>2</sub>s de *Echis carinatus sochureki*-ecarpholin (S49eca), e Asp49-PLA<sub>2</sub>s de *Notechis scutatus*-notexin (D49ntx), *B. jararacussu* (D49bjs), *Vipera ammodytes meridionalis*-vipoxin (D49vip), *Ophiophagus hannah* (D49oph), *Daboia russelli russelli* (D49drs). Espaços em branco (-) são introduzidos para ótimo alinhamento. Pontos (●) marcados para rede catalítica (Gly30, His48, Lys/Asp/Ser49, Tyr52, Tyr73 e Asp99), (+) marcado para cisteínas envolvidas no ponte dissulfeto. A sequência de aminoácidos está colorida pelas estruturas secundárias (α-hélice e β-folha) em azul (B) Alinhamento estrutural da estrutura do cristal de Lys49, Ser49 e Asp49 PLA<sub>2</sub>s. Representação da estrutura secundária de PLA<sub>2</sub>s mostrando a distribuição das estruturas secundárias (α-hélice e β-folha) (esquerda), a posição dos pontes dissulfeto (centro), e o local predito do sítio biológico inclusive o sítio catalítico em representação de vara (Gly30, His48, Lys/Asp/Ser49, Tyr52, Tyr73 e Asp99) (direita) (Adaptado de Cisne de Paula et al., 2009).

## 1.6. Neurotoxinas

Neurotoxinas são componentes presentes nos venenos de serpente e podem afetar o sistema nervoso de diferentes maneiras: bloqueando todos os impulsos nervosos, de forma que a presa fique paralisada e a respiração seja interrompida, ou sobrecarregando o sistema nervoso, levando-o ao colapso com sérias convulsões e a contração de todos os músculos, seguidas de morte. No entanto, nem todas as neurotoxinas têm o modo de ação ou produzem efeitos clínicos similares (Rodriguez-Acosta, 2001; Rodriguez-Acosta, 2003).

Um dos maiores alvos dos venenos das serpentes é o sistema nervoso somático, em particular a junção neuromuscular do músculo esquelético. A inibição da transmissão sináptica neuromuscular neste lugar produz paralisia da musculatura respiratória, como o diafragma, por exemplo, o que leva à morte (Lalloo et al., 1996). Por conseguinte, muitas das pesquisas têm sido dirigidas com o intuito de aumentar a compreensão sobre a ação do veneno das serpentes e das toxinas isoladas que agem na junção neuromuscular (Hodgson e Wickramaratna, 2002).

De acordo com Tu (1977), as neurotoxinas podem ser classificadas em dois grupos: 1) Inibidores da condução axônica, a estimulação do axônio que resulta da despolarização da membrana celular e envolve uma mudança na condutância dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$ . Assim, qualquer substância que altere o movimento normal, principalmente dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , pode ser considerada como sendo neurotóxica. Como exemplo pode-se citar a tetrodotoxina, que é uma neurotoxina isolada do veneno do baiacu ou "puffer fish", caracterizando-se por bloquear os canais de sódio (Narahashi et al., 1967; Hass et al., 1986). Toxinas do veneno de escorpiões também podem afetar condutividade do axônio, devido à sua atuação sobre os canais de sódio (Rochat et al., 1970, Zlotkin et al., 1971, Strichartz e Wang, 1986).

2) Inibidores da transmissão sináptica são aquelas toxinas que atuam sobre a condução axônica na transmissão sináptica na região da placa motora da junção neuromuscular, região especializada da fibra muscular onde o impulso nervoso, ao atingir a terminação nervosa pré-sináptica, determina a sua despolarização, ativando a entrada de íon cálcio para dentro da membrana, sinalizando a liberação do neurotransmissor. Estas atuam afetando a liberação do neurotransmissor (acetilcolina) e conseqüentemente impedindo a transmissão do impulso nervoso. Segundo Tu (1977) esta classe de toxinas que causam alteração da transmissão sináptica é dividida em dois grandes sub-grupos: as neurotoxinas pré-sinápticas ( $\beta$ -neurotoxinas) e as neurotoxinas pós-sinápticas ( $\alpha$ -neurotoxinas).

### **1.6.1. Neurotoxinas pré-sinápticas**

Denominadas como  $\beta$ -neurotoxinas, estas toxinas atuam inibindo o processo de liberação da acetilcolina. Sua potência é maior que a das neurotoxinas pós-sinápticas ( $\alpha$ -neurotoxinas). Como exemplo, a toxina  $\beta$ -bungarotoxina, uma toxina composta por duas subunidades de 8800 e 12400 daltons, interligadas por pontes dissulfeto (Chang e Lee, 1977, Kelly, 1979). Tanto as  $\beta$  quanto as  $\alpha$ -neurotoxinas são encontradas em venenos elapídicos, tal como *Bungarus multicinctus* ( $\alpha$  e  $\beta$ -bungarotoxina). Além disso, pode ser um polipeptídeo de cadeia simples (notexina) ou toxinas que consistem de múltiplas subunidades, por exemplo, crotoxina, taipoxina e textiloxina consistem de duas, três e cinco subunidades, respectivamente.

A maioria dos venenos contém múltiplas isoformas de uma neurotoxina que diferem em suas sequências de aminoácido (Harris, 1991). Após inúmeros estudos, não parece existir uma correlação direta entre cadeia estrutural e potência, assim, as atividades neurotóxicas não aparentam estar diretamente correlacionadas a sua atividade fosfolipásica e à subsequente hidrólise de fosfolipídios da membrana (Rosenberg, 1990). Em geral, estas toxinas produzem bloqueio neuromuscular por inibição na liberação de acetilcolina do nervo terminal. A ação neurotóxica caracterizada pelo bloqueio neuromuscular (como consequência da inibição na liberação da acetilcolina, no terminal nervoso) não altera significativamente a sensibilidade da placa motora para a acetilcolina, ou seja, quando age uma neurotoxina pré-sináptica, não necessariamente há destruição da fibra muscular.

### **1.6.2. Neurotoxinas pós-sinápticas**

São toxinas que se ligam aos receptores colinérgicos nicotínicos da região sub-sináptica da placa motora semelhante ao curare. Denominadas como  $\alpha$ -neurotoxinas, são capazes de bloquear de forma reversível a transmissão nervosa, ligando-se competitivamente aos receptores colinérgicos nicotínicos, evitando a transmissão neuromuscular e conduzindo a morte por paralisia flácida do diafragma (Karlsson, 1979, Tselin e Hucho, 2004). As neurotoxinas pós-sinápticas são peptídeos de baixo peso molecular (7 a 8 kDa), com 60 e 70 aminoácidos, desprovidos de atividade enzimática (Karlsson, 1979).

## 1.7. Regeneração muscular

A musculatura esquelética de mamíferos adultos possui grande capacidade de adaptação às necessidades do organismo. Ela é capaz de se regenerar após diversos tipos de traumas, como lesões, esmagamento, isquemia, denervação ou mesmo pelo crescimento normal e exercícios físicos, graças às células mioprecursoras. Essas células atuam no crescimento muscular pós-natal, na regeneração de fibras musculares danificadas e na manutenção do músculo esquelético do indivíduo adulto (Zammit e Beauchamp, 2001). Independente do tipo de lesão, a cicatrização muscular segue uma série de eventos estabelecidos (Lefaucheur e Sébille, 1995).

A patogênese de dano do tecido local induzido por venenos de serpentes botrópicas revelaram alterações que envolvem a ação de fosfolipases A<sub>2</sub> miotóxicas e metaloproteinases hemorrágicas (Teixeira et al., 2003). PLA<sub>2</sub>s miotóxicas podem ser usadas como modelo de estudo da regeneração muscular, devido ao fato de que elas induzem necrose, ativada pelo rompimento de miofibras do sarcolema, refletido no aumento de níveis de proteínas no plasma (CK), e não podem acarretar lesão de tecido vascular e nervoso, o que é de suma importância para o processo de regeneração muscular (Kasemkijwattana et al., 2000).

O processo de regeneração muscular que se segue à necrose local tem sido motivo de numerosos estudos experimentais (Queiróz *et al.*, 1984; Gutiérrez *et al.*, 1991; Arce *et al.*, 1991; Harris e Cullen, 1990, e Harris, 2003). O passo prévio ao processo de regeneração muscular é uma reação inflamatória celular com a presença de neutrófilos e macrófagos (Gutiérrez *et al.*, 1990), que são responsáveis pela fagocitose e remoção do tecido necrótico. Depois disso, o músculo esquelético pode se regenerar devido principalmente à atuação das células satélites, que são células miogênicas localizadas entre a membrana plasmática e a lâmina basal de fibras musculares adultas (Gutiérrez e Rucavado, 2000; Harris et al., 2003). Durante o processo degenerativo, as células satélites tornam-se ativadas, diferenciam-se em mioblastos, proliferam-se e fundem-se para formar os miotubos. Os miotubos, que são células multinucleadas com núcleos centrais enfileirados, diferenciam-se com o passar do tempo em fibras musculares multinucleadas (Gutiérrez e Ownby, 2003; Harris et al., 2003; Charge e Rudnicki, 2004; Tidball, 2005). A capacidade de regeneração resultante de uma lesão parcial ou total da fibra muscular depende de fatores como a população de células mioprecursoras, revascularização e reinervação (Asakura, 2003; Fanò et al., 2004).

Entender a estrutura da proteína ajuda a avaliar as razões que podem explicar o seu funcionamento. A serpente injeta um verdadeiro “coquetel” de constituintes orgânicos e inorgânicos na vítima, causando profundos danos aos tecidos e com iminência de necrose e até mesmo de morte. Dentre os principais componentes do veneno estão as enzimas PLA<sub>2</sub>s que, em contato com os tecidos do organismo provocam uma série de reações. Também é importante realçar que as PLA<sub>2</sub>s fazem parte da fisiologia, com importante função no controle de determinadas atividades celulares e também atuam na degradação dos fosfolipídios da dieta sendo esta a sua função fisiológica mais saliente. Mais, em outros organismos como serpentes ou os insetos, estas mesmas enzimas podem ter uma atuação como toxinas. Muitas das atividades farmacológicas da PLA<sub>2</sub> podem estar direta ou indiretamente ligadas à atuação enzimática da molécula, ainda que em estudos comparativos da estrutura dessas PLA<sub>2</sub>s todas tenham a mesma plataforma molecular. Provavelmente a gênese está na modificação de alguns aminoácidos, que podem induzir mudanças estruturais e funcionais da PLA<sub>2</sub>. Além dessa atividade enzimática, se tem despertado um grande interesse no seu potencial farmacológico.

## II. Objetivos

- 2.1. Isolar e purificar a toxina PLA<sub>2</sub> D49, BtTX-II, procedente do veneno *Bothriopsis taeniata*.
- 2.2. Caracterizar físico-quimicamente a BtTX-II purificada através de eletroforese de poliacrilamida (SDS-PAGE), dosagem protéica e sua composição de aminoácidos (Analisador de aminoácidos Pico-Tag).
- 2.3. Determinar a massa molecular nativa e alquilada por espectrometria de massa (MALDI-Tof-MS) e identificar os peptídeos trípticos por espectrometria de massa “*in tandem*” (ESI-QTof-MS/MS).
- 2.4. Caracterizar enzimáticamente a BtTX-II purificada através dos efeitos de temperatura, pHs, íons e concentração de substrato (4N3OBA).
- 2.5. Avaliar farmacologicamente das alterações funcionais em vários modelos experimentais, tais como: neurotoxicidade “*ex vivo*” na preparação *Biventer cervicis* de pintainho (BCp) e sua análise morfológica e quantitativa “*in vitro*”, miotoxicidade local e sistêmica “*in vivo*” através dos níveis séricos de creatina kinase (CK) plasmáticos no músculo gastrocnêmio de camundongo induzidos pela BtTX-II.
- 2.6. Avaliar a atividade edematogênica “*in vivo*” induzido no coxim plantar de camundongos e determinar a citotoxicidade “*in vitro*” na linhagem celular mioblastos/miotubos C2C12 de camundongos.
- 2.7. Investigar qualitativamente o dano e regeneração muscular em camundongos submetidos à BtTX-II (PLA<sub>2</sub> D49).



### **3.1. Veneno**

O veneno total de *Bothriopsis taeniata* procedente da Amazônia do Peru foi coletado, dessecado e cedido pelo Prof. Dr. Ronald Navarro Oviedo, da Escola de Biologia da Universidade Nacional de São Agustín de Arequipa – Perú.

### **3.2 Animais**

Foram utilizados para os ensaios biológicos camundongos machos Swiss (18 a 20 g) e pintainhos HY-Line W36 de 4 a 9 dias obtidos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram mantidos a 24–28°C com alimento e água *ad libitum*. Todos os ensaios biológicos foram realizados com autorização da Comissão de Ética para Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP (protocolo no 1492-1).

### **3.3. Purificação das toxinas de *Bothriopsis taeniata***

#### **3.3.1. Cromatografia de Exclusão Molecular**

Cinquenta miligramas do veneno total foram homogeneizados em 1ml de tampão bicarbonato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  1M pH 8,0. Esta solução de veneno foi então centrifugada a 9000 rpm por 5 minutos para clarificação. O sobrenadante obtido foi então aplicado à coluna de exclusão molecular (Kontex Flex Column 78x2 cm) contendo a resina Sephadex G-75, previamente equilibrada com  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0,2 M. A coluna foi eluída com tampão  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0,2 M a um fluxo constante de 0,25ml/min e monitorado a 280 nm. As frações foram coletadas em um coletor automático da Pharmacia Biotech, liofilizadas e armazenadas a –20°C.

#### **3.3.2. HPLC de fase reversa**

Todas as frações obtidas da cromatografia em sephadex G-75 foram testadas e a que apresentou atividade  $\text{PLA}_2$  (fração III), foi purificada em um sistema HPLC de fase reversa. O sistema cromatográfico usado 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  $\mu\text{l}$  e uma coluna Shim Pack CLC-ODS(M) C18 (4,6mm x 250 mm), previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%, (v/v) (tampão A) pH 3,5. Foram aplicados 5mg da fração III dissolvida em 120 $\mu\text{l}$  de tampão A (TFA 0.1%) e 80 $\mu\text{l}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  1M. A eluição da amostra foi realizada usando-se um gradiente linear (0–100%) com Tampão B (acetonitrila 66,5%, TFA 0,1%). A

corrida cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 1ml/min e monitorada a absorvância em 280nm. As frações obtidas foram liofilizadas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4. Caracterização bioquímica da BtTX-II**

#### **3.4.1. Dosagem protéica**

A dosagem da concentração de proteínas presentes no veneno total, frações da Sephadex G-75 e da toxina PLA<sub>2</sub> isolada, foi realizada através do método de Bradford (1976), baseado na mudança de cor do corante azul brilhante de Coomassie G-250 em resposta a diferentes concentrações de proteína, existindo em duas formas diferentes de cores, vermelho e azul. A cor vermelha é convertida para azul após ligação do corante com a proteína. O complexo proteína-corante possui alto coeficiente de extinção, conduzindo para uma grande sensibilidade da medida de proteína. Para determinação da curva padrão, utilizou-se albumina de soro bovino como proteína padrão, modelo que serviu como parâmetro para os resultados obtidos das amostras de *Bothriopsis taeniata*. A análise das amostras foi feita no comprimento de onda de 595 nm num leitor de ELISA, (VERSA Max microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) (Bradford, 1976).

#### **3.4.2. Eletroforese em SDS-PAGE**

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

A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments). As amostras e os marcadores de massa molecular foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075M, pH 6,8; 10% de glicerol; 4% de SDS; 0,001% de bromofenol). A corrida eletroforética foi realizada a 30 mA. Os géis foram corados com solução de Coomassie Blue 0,05% a  $37^{\circ}\text{C}$  e o excesso de corante foi removido em ácido acético 7%.

### **3.4.3. Determinação da atividade fosfolipásica (PLA<sub>2</sub>)**

A determinação da atividade PLA<sub>2</sub> foi realizada segundo o método descrito por Cho e Kézdy (1991), Holzer e Mackessy (1996) e adaptado para microplaca (Beghini et al., 2000).

A mistura para o ensaio contém 200 µl de tampão (Tris-HCl 10mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM e NaCl 100mM pH 8), 20 µl do substrato cromogênico 4-nitro-3-octanoyloxi-ácido benzoico (4N3OAB), 20 µl de água ou 20 µl de PLA<sub>2</sub>, sendo o volume final de 260 µl. Após a adição de 20 µl das PLA<sub>2</sub> em teste, a mistura foi incubada por 40 minutos a 37°C e as absorbâncias lidas a intervalos de 10 minutos.

A atividade enzimática expressa como a velocidade inicial da reação (V<sub>0</sub>) foi calculada baseada no aumento da absorbância após 20 minutos, e foram expressas em quantidades de produto formado nmoles por mg de proteína (enzima) por minuto (nmoles/mg/min). O ensaio foi realizado em triplicata e a reação lida a 425nm em um VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

### **3.4.4. Estudos cinéticos da BtTX-II**

Para o estudo das características bioquímicas de enzimas pode-se lançar mão de diversas ferramentas experimentais, uma das mais utilizadas é a obtenção de parâmetros cinéticos (K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub>) para os substratos sintéticos. O uso do substrato cromogênico específico (4N3OAB) para PLA<sub>2</sub> neste sistema de ensaio acuoso nos permitiu examinar a atividade da enzima, sem o uso de substratos radioativos ou solventes orgânicos, permitindo o acompanhamento da reação de hidrólise destas moléculas por leitura espectrofotométrica, facilitando enormemente a obtenção dos parâmetros cinéticos. Com a enzima BtTX-II purificada, foi realizada a caracterização cinética, os quais foram feitos em triplicatas e os resultados foram obtidos a partir de suas médias.

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

Os ensaios do efeito do pH sobre a atividade PLA<sub>2</sub> foram realizados em meios de reação preparados com diferentes valores de pH (4,0–10,0). Para cada valor de pH, foi feito um controle e a determinação da atividade PLA<sub>2</sub> foi feita conforme ao item 3.4.3. Os tampões utilizados nos experimentos foram: tampão citrato de sódio-HCl para pHs 4,0, 5,0 e 6,0, tampão Tris-HCl para pHs 7,0 e 8,0, e tampão Glicina-NaOH para pHs 9,0 e 10,0 respectivamente.

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

Para determinação da temperatura ótima, estudamos a atividade PLA<sub>2</sub> em meios de reação com temperatura variada de 25–45 °C. A atividade enzimática foi determinada conforme ao item 3.4.3., e foi lida em seguida a 425 nm.

#### **3.4.4.3. Efeito da concentração do substrato na atividade PLA<sub>2</sub>**

Este ensaio foi feito variando-se a concentração do substrato cromogênico 4N3OBA. As concentrações utilizadas foram: 40; 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,3; 0,2 e 0,1mM. A metodologia utilizada foi conforme ao item 3.4.3.

#### **3.4.4.4. Efeito inibitório por crotapotinas crotálicas na atividade PLA<sub>2</sub>**

Amostras de BtTX-II (1mg/ml) obtidas do veneno total como descritos anteriormente foram pré-incubados por 20 minutos no tampão de reação com as crotapotinas obtidas de venenos crotálicos (Cdt F5 e Cdt F7) de *Crotalus durissus terrificus* e (Cdcol F3 and Cdcol F4) de *Crotalus durissus colillineatus* na razão de 1:1 (W/W), o meio de pré-incubação foi o mesmo do ensaio enzimático sem a enzima nem a crotapotina. Após este tempo de incubação, o substrato cromogênico 4-nitro-3-octanoyloxi-ácido benzoico (4N3OBA) foi colocado no meio de reação, e após 20 minutos a 37°C, os ensaios foram lidos a 425nm no mesmo aparelho SpectraMax 340 descrito acima.

#### **3.4.4.5. Efeito dos íons na atividade PLA<sub>2</sub>**

A atividade fosfolipásica da BtTX-II foi estudada na presença dos íons divalentes: Mg<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup> e Zn<sup>+2</sup>. Para a preparação dos tampões, foram usados sais dos respectivos metais e a determinação da atividade PLA<sub>2</sub> foi feita conforme ao item 3.4.3.

#### **3.4.5. Análise da composição de aminoácidos.**

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

### **3.4.6. Análise da proteína por espectrometria de massas**

As análises da proteína BtTX-II por espectrometria de massas foram realizadas pela técnica MALDI-Tof MS, no Instituto de Psiquiatria Max Planck, em Munique, na Alemanha, e o análise dos peptídeos trípticos realizados pela técnica ESI-QToF-MS/MS, no laboratório de espectrometria de massas (MAS) de Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) CNPEM-ABTLUS, Campinas.

#### **3.4.6.1. Determinação da massa molecular da BtTX-II (MALDI Tof MS)**

A massa molecular da toxina nativa e alquilada foi analisada por Espectrometria de Massas, utilizando-se um Voyager DE PRO MALDI TOF espectrômetro de massas (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 1 µl da amostra dissolvida em TFA 0,1% é misturada a 2 µl da matriz ácido sinapínico (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid). A matriz foi preparada com 30% de acetonitrila e 0,1% (v/v) de TFA. A massa é analisada de acordo com os seguintes parâmetros: aceleração de voltagem 25 kV, laser ajustado a 2890 mJ/cm<sup>2</sup> em 300 ns e o modo de análise é linear.

Análises ESI-CID-MS/MS foram executadas usando um espectrômetro de massa híbrido tempo de voo-quadrupolo (Q-ToF Ultima de Micromass, Manchester, UK) equipado com uma fonte nano Zspray operando em um modo íon positivo. As condições de ionização de uso incluído uma voltagem capilar de 2,3 kV, um cone voltagem e lente de 30 V e 100 V, respectivamente, e a energia de colisão de 10 eV. A temperatura da fonte foi 70 °C e o cone de gás foi N<sub>2</sub> em um fluxo de 80 l/h; gás nebulizando não foi utilizado para obter o spray. Argônio foi usado para esfriamento colisional e para fragmentação de íons na célula de colisão. Calibração externa com iodeto de sódio foi feita sobre uma gama de massa desde 50 até 3000 m/z. Todos os espectros foram adquiridos com o analisador Tof em “Vmode” (Tof kV = 9.1) e o voltagem MCP fixado em 2150 V (Damico et al., 2005).

#### **3.4.6.2. Caracterização estrutural da BtTX-II por peptídeos trípticos**

Para a redução da proteína, adicionou-se DTT (Ditiotreitol) a 5mM de concentração final e incubou-se por 25 minutos à temperatura de 56 °C. Para a alquilação adicionou-se IAA (Iodoacetamida) a 14mM de concentração final incubando por 30 minutos à temperatura ambiente. Após redução e alquilação, é feita a adição da Tripsina (Promega-Sequence Grade Modified) diluída em (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,05M e a uma concentração de 20 ng/µl incubando a 37 °C por

16 horas. Em seguida, os peptídeos foram analisados através de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (nanoAcquity UPLC, Waters) associada a um espectrômetro de massa Q-ToF Ultima API (MicroMass/Waters).

Um estudo de sobreposição de peptídeos obtido da digestão pela tripsina será realizado, a partir da cadeia polipeptídica e massa determinada. Por fim, o alinhamento dos fragmentos peptídicos e sua homologia estrutural foram realizados com outras PLA<sub>2</sub>s de veneno de serpentes disponíveis em banco de dados, dentro eles o NCBI-BLAST (Altschul et al., 1990).

### **3.5. Caracterização farmacológica da BtTX-II**

#### **3.5.1. Atividade miotóxica**

Para a determinação da atividade miotóxica local e sistêmica produzidas a partir da exposição à toxina em estudo, grupos de 5 camundongos (18 a 20g) receberam injeções intramuscular (músculo gastrocnêmio) e intravenosa (veia caudal) respectivamente, de quantidades variadas da toxina dissolvidas em 50 µl de tampão PBS, sendo que o grupo controle recebe apenas PBS.

Após a aplicação da toxina, em intervalos de tempo (2, 4, 6, 9, 12 e 24 horas), as amostras de sangue foram coletadas da cauda em tubos capilares heparinizados e o plasma removido. Após centrifugação dos capilares na centrífuga para hematócrito durante 5 min, foram determinados os níveis plasmáticos de creatina kinase (CK) (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Esta atividade enzimática é medida através do ensaio cinético utilizando o kit CK–NAC Método Cinético-UV (LABORLAB), assim 200 µl do substrato reconstituído são pré-incubados por 4 minutos a 37 °C, logo são acrescentados 4 µl de plasma obtido por centrifugação do sangrado da cauda do camundongo. A mistura é incubada por 6 minutos registrando as leituras dos minutos 3, 4, 5 e 6. Determina-se a diferença média de absorbância por minuto ( $\Delta A/\text{min}$ ), diminuindo cada leitura da anterior e tirando a média dos valores. A média foi multiplicada pelo fator 8095. As leituras foram feitas em leitor de microplacas VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), no comprimento de onda de 340 nm. A atividade foi expressa em U/l, definida como a fosforilação de 1 mmol de creatina/min a 25°C.

#### **3.5.2. Atividade edematogênica**

Para a determinação da atividade formadora de edema, ocasionada pela toxina isolada BtTX-II em estudo, grupos de 5 camundongos (18-20 g) receberam a toxina por injeção via

subplantar no coxim plantar de uma das patas traseiras de camundongo. Inoculou-se diferentes concentrações da toxina dissolvidos em 50 µl de tampão PBS de cada tratamento de toxina no coxim plantar da pata posterior direita do camundongo; a pata posterior esquerda foi injetada com o mesmo volume de PBS (50 µl) como controle.

Foram feitas medições em diferentes intervalos de tempo (1 hora, 2, 3, 6, 12 e 24 horas) após da injeção da toxina. O edema foi expresso e baseado na porcentagem de edema produzido, mediante comparação entre o aumento em milímetros da pata inoculada com a toxina e o aumento da pata inoculada com solução de PBS. A concentração mínima de formação de edema foi definida como a concentração de toxina que induz 30% de edema (Lomonte *et al.*, 1993).

### 3.5.3. Atividade neurotóxica

A preparação neuromuscular foi isolada e montada conforme descrito por Ginsborg e Warriner (1960). Os animais (pintainhos) foram sacrificados sob anestesia inalatória, utilizando-se Forane® (Isoflurano, Laboratório Abbott). O músculo *Biventer cervicis* foi removido e suspenso em uma cuba de 5 ml (Automatic organ multiple-bath LE01 Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain), submetida a uma tensão constante de 1 g, contendo solução nutritiva de Krebs (pH 7,5) da seguinte composição (em mM): NaCl 118,7; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 1,88; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,17; MgSO<sub>4</sub> 1,17; NaHCO<sub>3</sub> 25,0 e C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11,65 em água Milli-Q. A solução foi submetida à aeração constante com carbogênio (mistura 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) e os ensaios foram realizados à temperatura de 37°C.

O músculo foi estimulado por meio de eletrodos bipolares de anel de platino (estimulação de campo) e colocado ao redor do tendão ao qual recorre o músculo inervado. Foram aplicados pulsos supramaximais através de um estimulador (estimulador Grass S48, Powerlab AD Instruments Barcelona, Spain) sob as seguintes condições: 0,1 Hz de frequência, 0,2 ms de duração, 5-6 V para a estimulação indireta.

As contrações musculares resultantes de estímulos elétricos maximais e as contraturas em resposta à adição de KCl (20 mM) e ACh (73,3 µM) foram registradas em fisiógrafo Gould RS3400, por meio de transdutores isométricos Load Cell BG-10 GM, acoplado a um registrador PowerLab/4SP (OUAD Bridge AD Instruments, Barcelona, Spain). Os registros das contraturas para KCl e ACh foram realizados com ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição da toxina fosfolipasa A<sub>2</sub>) e no final do experimento (após 120 min de incubação com o veneno). As concentrações de toxina utilizadas foram 5, 10, 20 e 50µg/ml.

Antes da adição de cada concentração de BtTX-II, foi testada a resposta a Acetilcolina (ACh; 73,3  $\mu$ M por 60 s) e K<sup>+</sup> (KCl 20 mM por 130 s), na ausência da estimulação de campo. Para os ensaios controle foram adicionados 0,2 ml da solução Krebs (Prianti et al., 2003).

Os testes farmacológicos da neurotoxicidade foram realizados nos Laboratório de química de proteínas (Departamentos de Bioquímica) e Laboratório da junção neuromuscular (Departamento de Farmacologia) da UNICAMP, Campinas, Brasil.

### **3.5.3.1. Análise histológica do músculo *Biventer cervicis* de pintainho**

Ao final dos experimentos, após a exposição a diversas concentrações, por 120 minutos, as preparações de *Biventer cervicis* de pintainho foram retiradas e fixadas em solução Bouin, por 24 horas. Para este procedimento foi utilizado n=5 para cada protocolo e a fixação foi seguida pela desidratação e inclusão em Parafina. A confecção das lâminas histológicas foram seguidas pela obtenção das secções (2  $\mu$ m de espessura) de cada experimento, através do micrótomo (Leika RM 2035), em seguida, foram montadas em lâminas e coradas com hematoxilina:eosina (HE). As lâminas foram observadas em microscópio óptico (Olympus BX51) acoplado a um microcomputador. Após análise quantitativa do material histológico (análise obtida por três diferentes leitores), foi processada a documentação fotomicrográfica dos resultados obtidos, através do microscópio Olympus BX51, com a utilização do programa Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc.) para a captura de imagens que foram armazenadas em formato TIF, com uma resolução de 640x480 pixel de tamanho.

De cada corte muscular foram analisados cinco campos microscópicos diferentes. O número de fibras com lesão foi representado como porcentagem do número total de fibras (normal + lesada) em cada campo. Este estudo foi realizado utilizando um sistema de análise de imagens computadorizado (Leica Germany, Qwin).

As observações das lâminas e os registros fotográficos foram feitos no Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, em Campinas, Brasil.

### **3.5.4. Diferenciação das células da linhagem C2C12**

A linhagem celular C2C12 é um subclone da linhagem celular de mioblastos C2 derivada de células satélites de camundongos adultos (Lopes-Martins et al., 2006). As células C2C12 cresceram em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Cultilab), sempre a

37°C em um ambiente úmido e a 5% CO<sub>2</sub>. As células foram mantidas em estado de subconfluência e repicadas a cada 2 ou 3 dias.

Antes dos experimentos, todas as culturas foram examinadas e a sua viabilidade foi confirmada pelo método de exclusão do azul de trypan. Para induzir o estresse celular, metade das culturas foi cultivada em DMEM suplementado com apenas 5% de FBS por 24hs antes de cada experimento. Esta situação *in vitro* produz estresse similar às condições de estresse *in vivo*, reduzindo as taxas de crescimento celular (Pereira et al., 2002; Azevedo et al., 2006).

A diferenciação de mioblastos até miotubos realizou-se durante 72 h pela privação do soro fetal bovino. Para isto, logo com a formação da monocamada de mioblastos, substituiu-se o meio de crescimento usual (DMEM-5% de FBS) por meio suplementado com só 1% de FBS e deixou-se em 37°C – 5% CO<sub>2</sub> durante 3 dias até observar uma grande proporção de miotubos multinucleados entre os mioblastos (Clemente et al., 2005).

### **3.5.5. Ensaio de citotoxicidade**

Para os ensaios de citotoxicidade, utilizaram-se mioblastos indiferenciados obtidos de monocamadas subconfluentes como indicado no item anterior. As células ressuspensas são semeadas em placas de 96 poços, 1.5-2.5 x 10<sup>4</sup> células por poço, no mesmo meio de crescimento (DMEM-FBS 5%). Nos ensaios realizados com mioblastos, ao atingir a monocamada um 80% de confluência, retirou-se o meio de cultura e a isoforma de PLA<sub>2</sub> isolada foi diluída no meio de cultura acrescido com 5% de FBS e adicionadas às células de cultura (200 µl/poço). Para os ensaios com miotubos, procedeu-se à diferenciação como mencionado no item anterior. Após 3 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida, a viabilidade celular foi quantificada por coloração com o corante Cristal violeta 1% (Saotome et al., 1989). A citotoxicidade foi avaliada por comparação das absorbâncias da PLA<sub>2</sub> testada com as absorbâncias utilizadas como controle (consideradas 100% de viabilidade) e foram expressas como porcentagem de viabilidade celular. A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 620 nm em leitor de ELISA. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

Os experimentos de cultura celular foram realizados na Faculdade de Ciências Exatas, Naturais e de Agrimensura (Departamento de Bioquímica) da Universidade Nacional do Nordeste, UNNE, Cidade de Corrientes, Argentina.

### **3.5.6. Análise histológica da regeneração muscular por microscopia óptica**

Os animais foram divididos em cinco grupos de 3 camundongos. Cada grupo foi sacrificado, após a aplicação da toxina, nos seguintes tempos de análise (1, 7, 14, 21 e 28 dias após início do experimento) no músculo gastrocnêmio de camundongo com a concentração de 10 µg/50 µl de PBS, com a qual se produz um dano muscular. Ao final da fase experimental, os animais foram sacrificados por excesso de concentração excessiva de um agente anestésico inalatório halogenado, o isoflurano (Forane®, do laboratório Abbott). Os músculos gastrocnêmio foram cuidadosamente retirados por meio de equipamentos cirúrgicos.

Concluído o tempo de tratamento, os músculos foram fixados em tampão formaldeído 10% durante pelo menos 48 h. Para processar o material, utilizou-se a técnica histológica clássica para inclusão em blocos com parafina (Michalany, 1980) e cortados em micrótomo do tipo Minot em 5 µm e coradas com Hematoxilina e Eosina e ácido periódico de Schiff. As observações morfológicas foram feitas em microscópio com microscópio Olimpo BX41.

A análise digital das imagens foi feita usando o sistema Image ProPlus 4.1.0.1® (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA), conectado a uma PC Pentium III Intel. As imagens foram geradas por máquina fotográfica vídeo Sony ExwaveHAD, conectado a um microscópio Olimpo CH2 com fonte de energia estabilizada. Utilizaram-se lentes com objetivas planocromáticas de 4x, 10x, 40x e 100x aumentos.

O microscópio foi calibrado de fábrica para alcançar uma iluminação de tipo Koehler; uma imagem de um campo vazio foi usada para medir a iluminação. As imagens foram armazenadas em formato TIF, com uma resolução de 640x480 pixel de tamanho e 32 bits de cor.

A análise histopatológica e fotografias foram realizadas no laboratório do Departamento de Farmacologia da Escola de Ciências Veterinárias da Universidade do Nordeste, UNNE, na cidade de Corrientes, Argentina.

### **3.6. Análise estatística**

Cada protocolo experimental (Estudos cinéticos, miografias e determinação de CK, análise histológico do músculo *Biventer cervicis*) foi repetido pelo menos 3 vezes, e os resultados reportados como a média ± erro padrão. ANOVA seguido por teste múltiplo “Tukey-Kramer” foi usado para comparação estatística dos dados (análise de significância). O valor de  $p < 0.05$  foi considerado significativo.

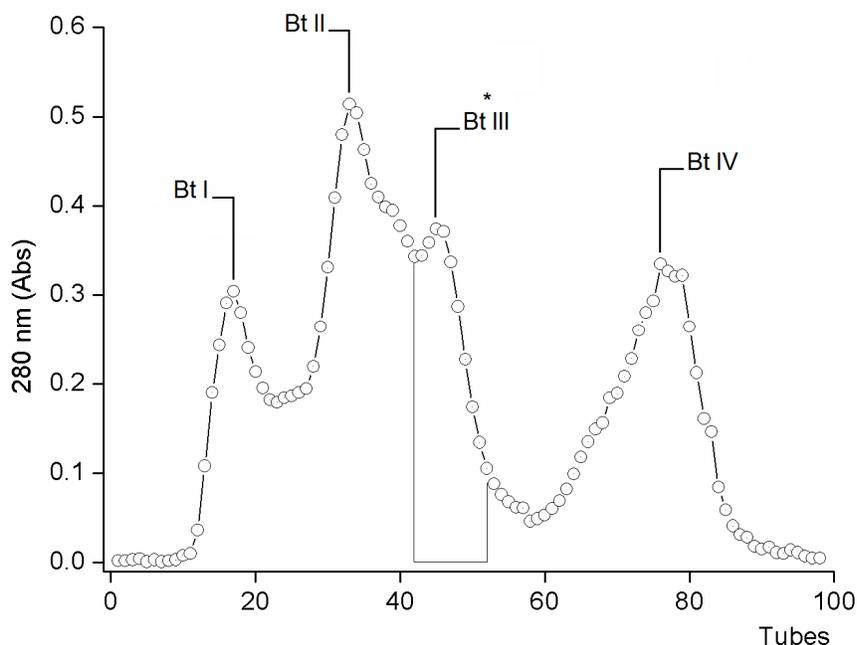
## 4. Resultados

### 4.1. Caracterização bioquímica da BtTX-II

#### 4.1.1. Purificação da fração Bt-III a partir do veneno de *Bothriopsis taeniata* em cromatografia de exclusão molecular

A coluna de Sephadex G-75 (Kontex Flex Column 78 x 2cm) foi previamente equilibrada com tampão  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0,2 M, pH 8,0. Foram dissolvidos e homogeneizados 50 mg de veneno total de *Bothriopsis taeniata* em 1 ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  1M. O extrato total foi clarificado centrifugando a amostra a 9000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi aplicado na coluna cromatográfica e a eluição realizada usando-se o tampão de equilíbrio  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0,2 M pH 8,0).

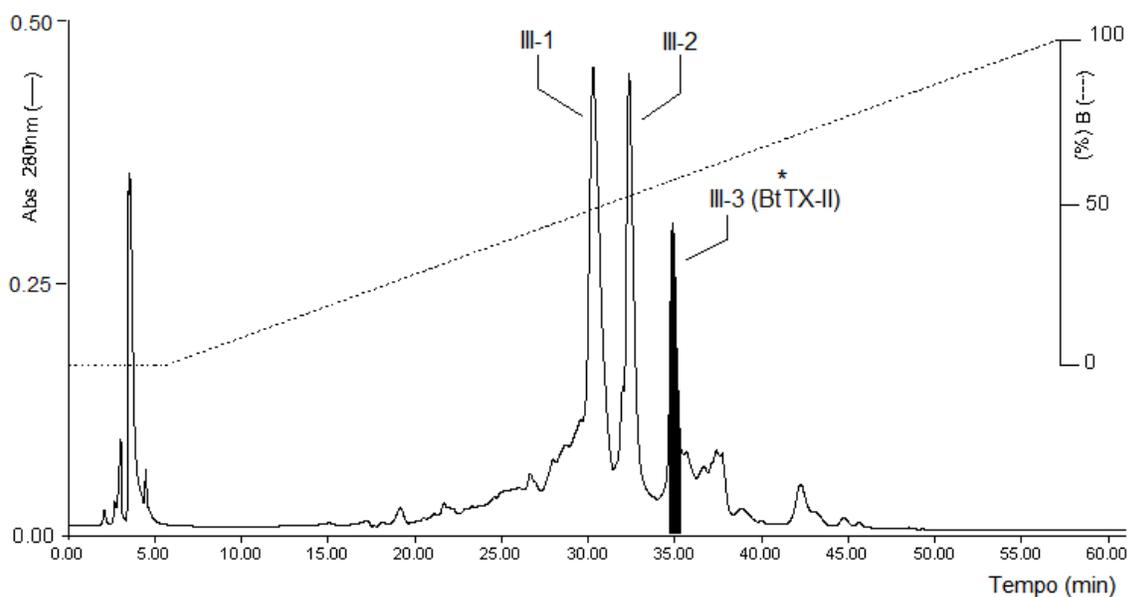
O perfil cromatográfico mostrou a presença de quatro frações proteicas principais, as quais foram denominadas como Bt-I, Bt-II, Bt-III e Bt-IV respectivamente (Figura 8). A atividade  $\text{PLA}_2$  foi avaliada e somente detectada nos tubos 41 ao 52 (—), que corresponde à fração Bt-III, a qual representa o 15,40 % do peso seco do veneno total, esta fração foi submetida a uma nova etapa cromatográfica de purificação em sistema de HPLC. A fração Bt-I apresentou atividade proteolítica e hemorrágica, a fração Bt-II atividades proteolítica e fibrinolítica e a fração Bt-IV não apresentou nenhuma atividade proteolítica.



**Figura 8.** Cromatografia de exclusão molecular do veneno de *Bothriopsis taeniata* em coluna de Sephadex G-75. O veneno foi eluído com tampão  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (0,2 M pH 8,0) a um fluxo constante de 0,25ml/min e monitorado a 280 nm. A fração Bt-III (—) foi a única que mostrou atividade  $\text{PLA}_2$ .

#### 4.1.2. Purificação da BtTX-II a partir da fração Bt-III em um sistema HPLC de fase reversa

A fração Bt-III anteriormente obtida foi submetida a mais uma etapa de purificação em HPLC de fase reversa. A corrida foi realizada em uma coluna Shim Pack CLC-ODS C18 (4,6 mm x 250 mm) analítica, acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa 991-PDA. O perfil cromatográfico (Figura 9) evidenciou a presença de 3 frações majoritárias que foram denominadas como III-1, III-2 e III-3, sendo que somente o pico III-3 apresentou atividade PLA<sub>2</sub>. A fração Bt III-3 foi renomeada como BtTX-II (\*).

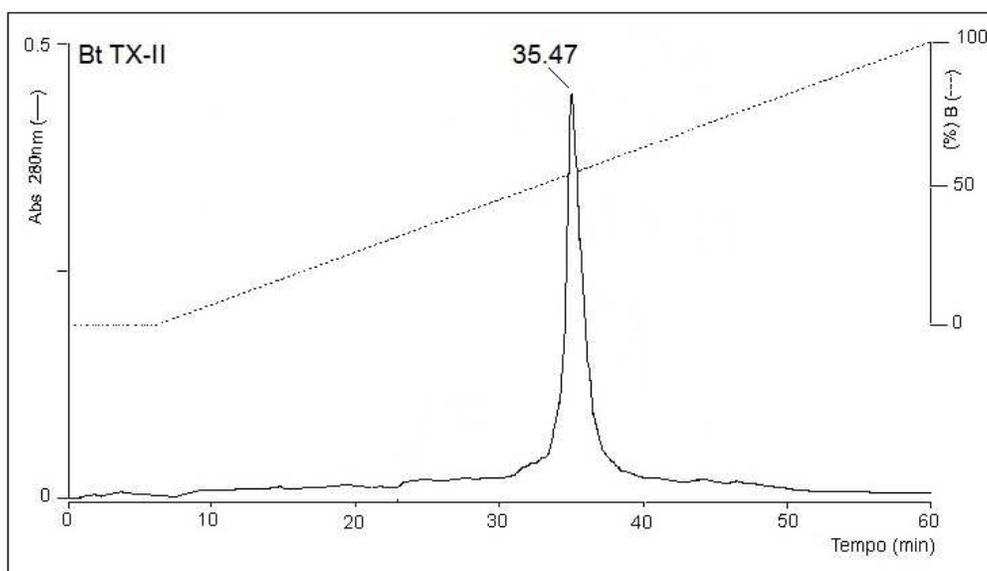


**Figura 9.** Perfil cromatográfico de purificação da fração Bt-III em HPLC de fase reversa. 5 mg da fração III foram dissolvidos em 200 µl de TFA a 0,1% e foi aplicado em uma coluna Shim Pack CLC-ODS C18. A eluição da amostra foi realizada usando-se uma gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (Acetonitrila 66,5%, TFA 0,1%). O fluxo foi mantido constante a 1ml/min. O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 280 nm de absorvância.

#### 4.1.3. Re-cromatografia em HPLC de fase reversa da fração BtTX-II

Para confirmar o grau de pureza, a fração BtTX-II foi submetida a uma etapa de re-cromatografia em HPLC de fase reversa nas mesmas condições 4.1.2. O perfil da re-cromatografia da fração BtTX-II (Figura 10) evidenciou a presença de um único pico de eluição para esta proteína.

A PLA<sub>2</sub> BtTX-II foi eluída no tempo de retenção de  $35,47 \pm 0,9$  min e em uma concentração de  $57,8 \pm 0,7\%$  de tampão B (Acetonitrila 66,5 % + TFA 0,1%).



**Figura 10.** Re-cromatografia de BtTX-II (PLA<sub>2</sub> D49) em HPLC de fase reversa usando uma coluna Shim Pack CLC-ODS(M) C18 (4,6mm x 250mm: Waters 991-PDA). As proteínas são eluídas a través de um gradiente linear contínuo (0-100%) de concentração do tampão B (acetonitrila 66,5%, TFA 0,1%). O fluxo é mantido constante a 1ml/min e monitorado a 280 nm.

#### 4.1.4. Tabela de purificação da BtTX-II

O veneno total de *Bothriopsis taeniata* foi fracionado em 4 picos ao ter sido passado por uma resina Sephadex G-75 (exclusão molecular). A atividade fosfolipásica estava presente somente no terceiro pico (Bt III). No segundo passo cromatográfico em HPLC de fase reversa utilizando uma coluna C-18, foi resolvido em 3 picos principais, sendo a fosfolipase A<sub>2</sub> diferenciada no terceiro pico. A metodologia usada nos permitiu a purificação, isolamento e concentração da PLA<sub>2</sub> (BtTX-II). A combinação destas etapas resultou apropriada, já que envolve diferentes mecanismos de separação para nossa proteína de interesse.

Após o primeiro passo, a PLA<sub>2</sub> D49 (BtTX-II) foi purificada 35,53 vezes, necessária para obter a enzima num estado homogêneo e no segundo passo foi purificada 92,30 vezes, com rendimento de 58,90 % em relação ao veneno total.

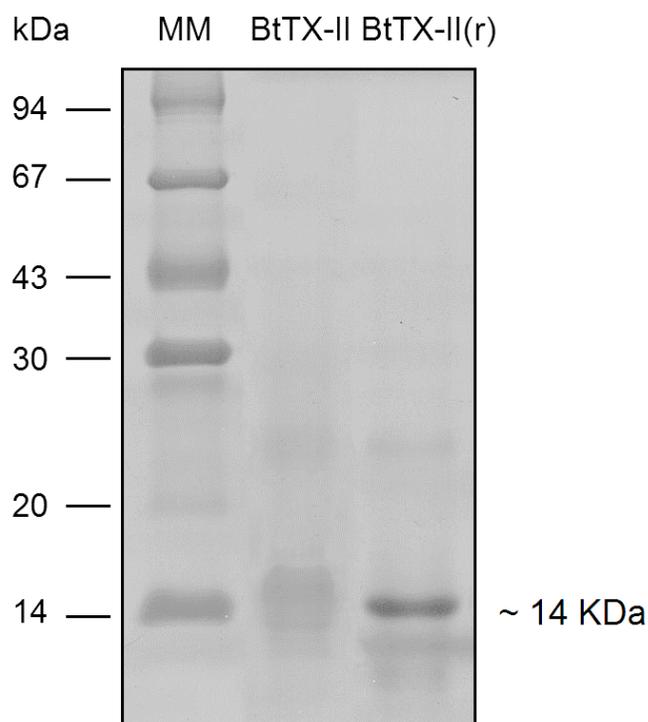
A Tabela 1 exibe um resumo das etapas do processo de purificação, assim como o cálculo de atividade específica e recuperação. Mostram-se os parâmetros da fração com atividade enzimática BtTX-II.

**Tabela 1** Purificação e cálculo de atividade específica da fosfolipasa A<sub>2</sub>, BtTX-II isolada do veneno de *Bothriopsis taeniata*.

<b>Etapa de Purificação</b>	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Proteína (mg/ml)</b>	<b>Atividade (U/ml)</b>	<b>Atividade Total (U.T.)</b>	<b>Atividade Específica (U/mg)</b>	<b>Rend. (%)</b>	<b>Purif. (vezes)</b>
Veneno Total	12	0,1966	109,26	1311,0	555,85	100,00	1,00
Sephadex G-75 (Bt-III)	3,6	0,0144	284,39	1023,8	19746,97	78,08	35,53
HPLC-FR (BtTX-II)	1	0,0151	772,30	772,3	51303,31	58,90	92,30

#### 4.1.5. Eletroforese em SDS-PAGE da fração BtTX-II

A eletroforese em SDS-PAGE mostra que a fração BtTX-II (Figura 11) sob condições reduzidas e não reduzidas revelou a presença de uma banda ao redor de 14 kDa, evidenciando um padrão semelhante aos outros venenos botrópicos com esta família de proteínas, enzimas cataliticamente ativas PLA<sub>2</sub> D49.



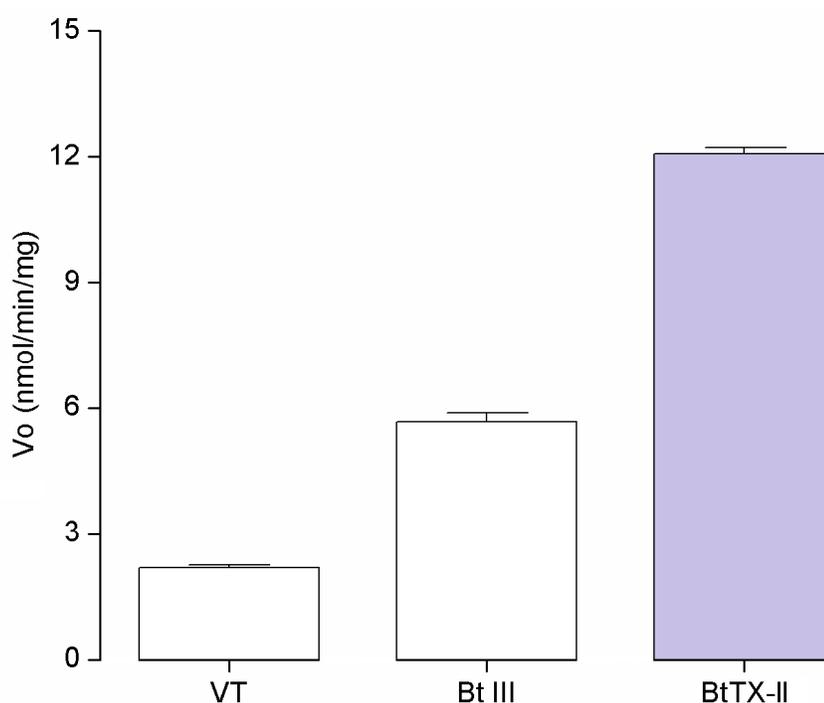
**Figura 11.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (M/V) em condições reduzidas com DTT e não reduzidas, corado com Comassie blue 0.05% e o excesso de corante foi removido em ácido acético 7%. As pistas eletroforéticas correspondem aos Marcadores de massa molecular (MM), BtTX-II em condição não reduzida e BtTX-II(r) em condição reduzida com DTT (Ditiotreitol). Marcadores moleculares: Fosforilase b-94, Albumina-67, Ovoalbumina-43, Anidrase carbônica-30, inibidor de tripsina-20,1 e  $\alpha$  Lactoalbumina-14,4). A corrida foi realizada com amperagem constante de 30 mA.

#### 4.1.6. Determinação da atividade PLA<sub>2</sub> (Veneno total, Fração Bt III e BtTX-II)

A medida da atividade PLA<sub>2</sub> foi realizada segundo descrito anteriormente, usando o 4N3OBA [4-nitro-3-(octanoyloxy) ácido benzoico] como substrato cromogênico.

A atividade PLA<sub>2</sub> foi expressa como velocidade inicial de reação ( $V_o$ ). O valor da atividade para o veneno total de *Bothriopsis taeniata* foi de  $2,185 \pm 0,078$  nmoles/min, da fração Bt-III foi de  $5,668 \pm 0,091$  nmoles/min e BtTX-II com atividade de  $12,075 \pm 0,138$  nmoles/min respectivamente, mostrando que somente a fração BtTX-II purificada apresenta alta atividade enzimática quando comparada com a atividade do veneno total e da fração Bt-III.

A fração BtTX-II corresponderia a uma enzima PLA<sub>2</sub> (D49), por apresentar propriedades de PLA<sub>2</sub> com uma massa relativa de ~14 kDa e mostrar atividade catalítica sobre o substrato cromogênico 4N3OBA.



**Figura 12.** Atividade PLA<sub>2</sub> proveniente do veneno total de *Bothriopsis taeniata* (VT), a fração III proveniente do sephadex G-75 (Bt-III) e a fração BtTX-II proveniente do HPLC-FR, utilizando o substrato cromogênico 4N3OBA. A Proteína (BtTX-II) foi considerada para caracterização bioquímica e biológica. (n=3).

## 4.2. Análise estrutural da BtTX-II

### 4.2.1. Análise da composição de aminoácidos da fração BtTX-II

Com relação à análise da composição de aminoácidos (Tabela 1) da proteína, BtTX-II indicou a presença de aminoácidos básicos (His, Lys e Arg) que representam o 20,74 % dos aminoácidos totais para BtTX-II. Além disso, esta enzima possui 41,48 % de aminoácidos hidrofóbicos. A fração apresenta 122 resíduos de aminoácidos com presença de 14 cisteínas. O ponto isoelétrico (*pI*) teórico da proteína, calculada da separação e análise da composição de aminoácidos (Sistema PICO-TAG) e utilizando o Software Suíte DNASTAR Lasergene EditSeq, foi ligeiramente básica de 7,84. Todas estas características sugerem que a fração BtTX-II se trata de uma enzima PLA<sub>2</sub> (D49) devido a sua semelhança físico-química com este grupo de proteínas.

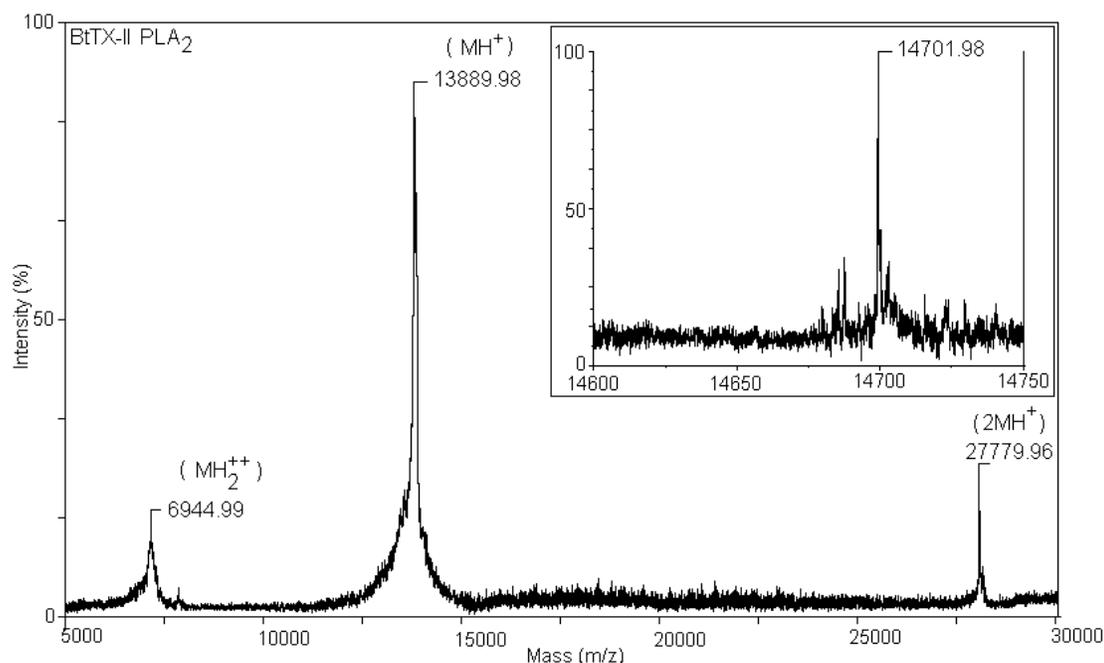
Aminoácidos	Bt TX-II
Asx	11
Glx	12
Ser	2
Gly	12
His	2
Arg	4
Thr	8
Ala	6
Pro	7
Tyr	10
Val	4
Met	2
Cys	14
Ile	5
Leu	6
Phe	4
Lys	13
Trp	ND
<b>Total</b>	<b>122</b>

**Tabela 2** Composição de aminoácidos da fração BtTX-II isolada de veneno de *Bothriopsis taeniata*. Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteína. (ND) = não determinado.

#### 4.2.2. Determinação de massas moleculares por Espectrometria de Massas (MALDI-TOF MS) da fração BtTX-II

Através desta análise, foi constatada a pureza da fração BtTX-II, obtida a partir da cromatografia em HPLC de fase reversa da fração Bt-III, procedente do veneno total de *Bothriopsis taeniata*.

A fração BtTX-II apresenta massa molecular de 13889,98 Da (Figura 13). A determinação da massa molecular real mostra que não existe diferença significativa entre as massas determinadas pela eletroforese em SDS-PAGE. De acordo com o tipo de técnica empregada de espectrometria de massa (MALDI-Tof MS), pode-se apreciar a presença de outros picos a mais, um de massas 6944,99 Da e outro de 27779,96 Da respectivamente. O primeiro pico representa a metade da massa real mais um próton ( $H^{2++}$ ), e o segundo pico, a massa real vezes dois, referindo-se à formação de um dímero ( $2X$ ), o que confirma que os parâmetros empregados na determinação de tipo linear foram adequadamente calibrados com o respectivo calmix de acordo com a massa a determinar.



**Figura 13.** Determinação da massa molecular da BtTX-II (PLA<sub>2</sub>D49) nativo por espectrometria de massa MALDI-TOF MS. As espécies  $MH^+$ ,  $MH^{2++}$  e  $2MH^+$  são mostradas no espectro de massa. Inseto representa o espectro de massa MALDI-TOF MS, mostrando multiplex canais de alquilação da BtTX-II alquilada.

### 4.2.3. Sequenciamento de peptídeos trípticos da fração BtTX-II

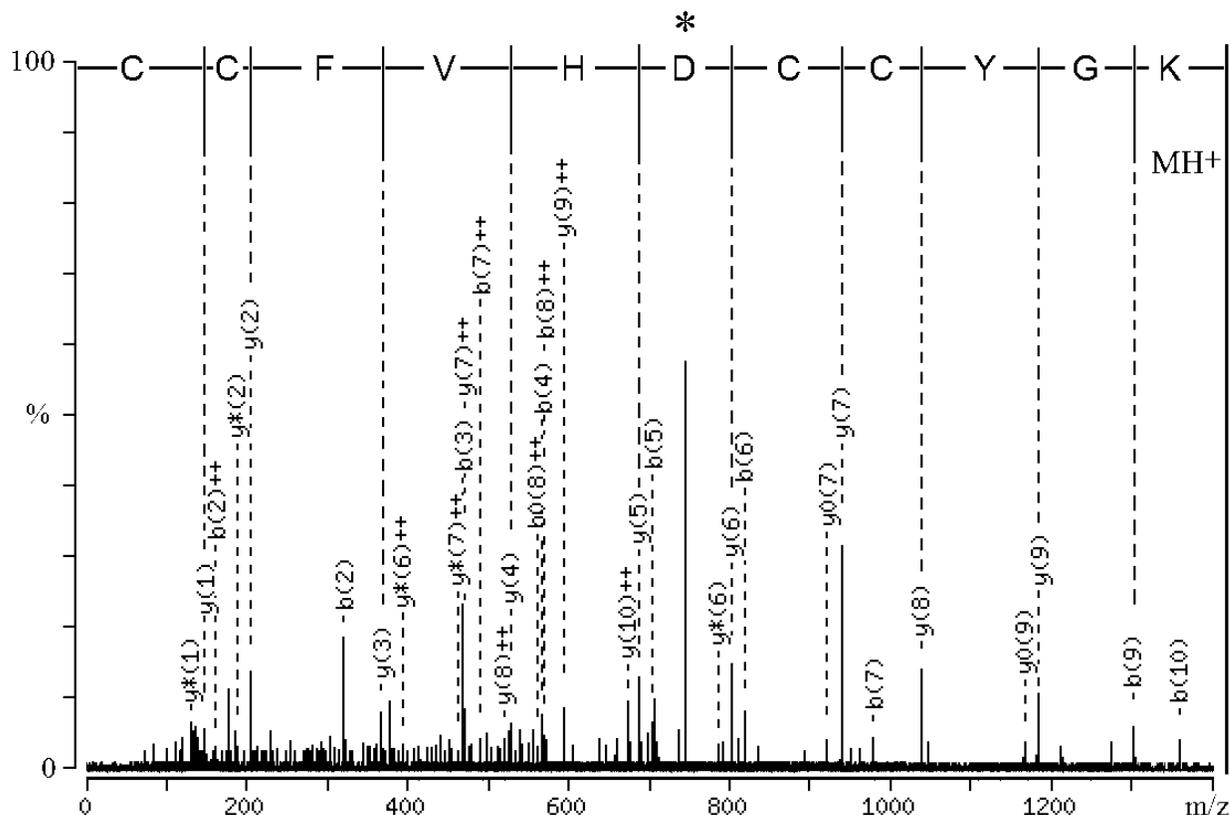
A PLA<sub>2</sub> foi digerida com tripsina e alguns peptídeos trípticos foram separados por RP-HPLC, detectados e caracterizados, sendo as massas moleculares medidas e as sequências de aminoácido deduzidas pela fragmentação do íon selecionado, originando fragmentos de íons tipo *b* e *y*, que foram obtidas por ESI-QToF-MS/MS baseadas nos peptídeos trípticos de BtTX-II (PLA<sub>2</sub> D49) (Tabela 3). A hidrólise através de tripsina da ligação peptídica formada por lisina é mostrada em tipo negrito. Todas as massas moleculares foram informadas como monoisotópicas.

**Tabela 3.** Massas moleculares medidas e sequências de aminoácidos deduzidas de peptídeos trípticos obtidas da proteína de alquilada no pico BtTX-II.

BtTX-II (PLA <sub>2</sub> )			
Fração de HPLC	Massa Medida (Da)	Sequência de Aminoácido	Massa Teórica (Da)
1	1377.7115	DL/IWQ/KFGQ/KMI/LL/ <b>IK/Q</b>	1377.6687
2	2599.1301	L/IPFPYTTYGCYCGWGGQ/KGQ/ <b>KPK/Q</b>	2599.1233
3	1504.5356	CCFVHDCCY <b>GK/Q</b>	1504.4954
4	1661.7389	ENGVLI/LCGEGTP <b>CEK/Q</b>	1661.6716
5	951.3790	Q/KI/LCECD <b>K/Q</b>	951.3886
6	793.3905	AAAVCFR	793.3890
7	1414.6737	RYMAYPDVL/ <b>ICK/Q</b>	1414.6905
8	975.4549	IDSYTY <b>SK/Q</b>	975.4623

#### 4.2.4. Determinação do peptídeo contendo o sítio catalítico por espectrometria de massa (MS/MS)

Um dos peptídeos trípticos revelou ser parte do sítio catalítico e/ou região característica da família de PLA<sub>2</sub> de veneno de serpente, e foi observado na fração 3 da enzima BtTX-II, tendo a seguinte sequência de aminoácidos deduzidas do peptídeo: “CCFVHDCCYGK” para PLA<sub>2</sub> D49 observado no espectro de massa MS *in tandem* (Figura 14).

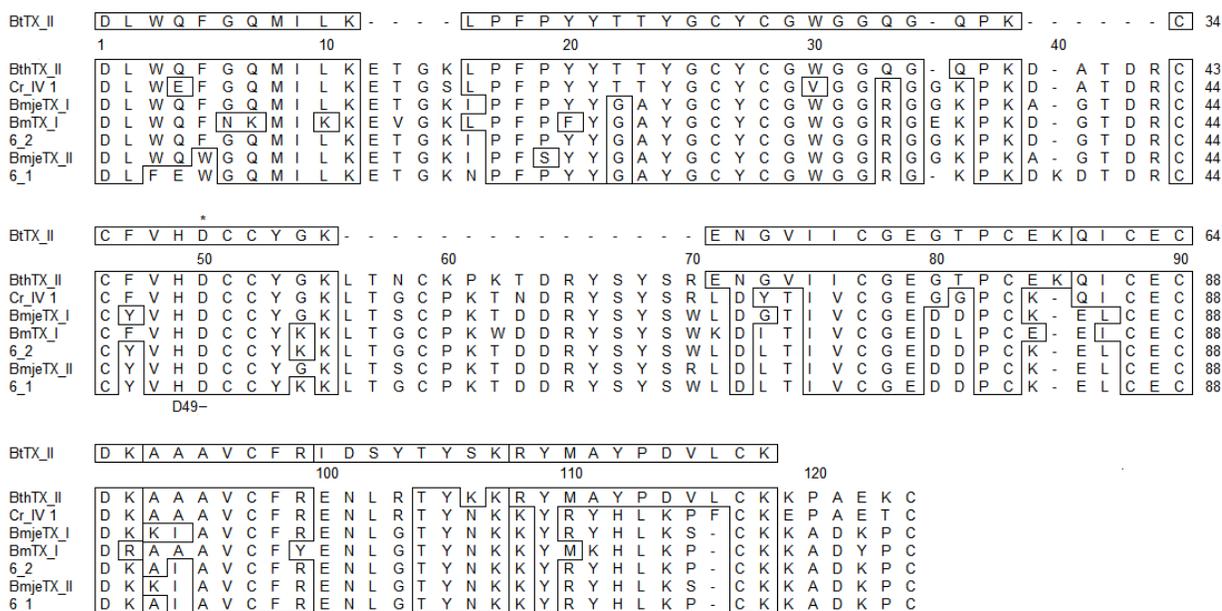


**Figura 14.** Espectro ESI-QTOF-MS/MS do peptídeo tríptico com uma massa de 1056,20 Da. Série de fragmento de íons *b* do peptídeo tríptico de 11-resíduo-longo na fração 3 do RP-HPLC da Bt TX-II (PLA<sub>2</sub>D49) alquilada contendo o resíduo aspartato na posição 49 na sequência de aminoácido.

#### 4.2.5. Homologia sequencial dos peptídeos determinados da BtTX-II

A homologia sequencial dos peptídeos determinados pela espectrometria de massa *em tandem* da fração com atividade fosfolipásica, BtTX-II mostrou similaridade com outras sequências de PLA<sub>2</sub>s miotóxicas do gênero viperidae já determinadas e registradas, como mostrado na figura 15.

O alinhamento dos peptídeos determinados revelou o sítio catalítico, onde o aminoácido D49 está presente. A presença deste aminoácido nesta posição torna possível a ligação com o íon cálcio, condição essencial para as PLA<sub>2</sub>s exercerem sua atividade enzimática. As sequências dos demais peptídeos indicariam que são parte de regiões altamente conservadas, assim como também de regiões variáveis.



**Figura 15.** Comparação da sequência de aminoácido dos peptídeos trípticos de BtTX-II PLA<sub>2</sub>D49 provenientes com outras PLA<sub>2</sub>s de venenos de serpentes: BthTX-II de bothropstoxin II from *Bothrops jararacussu* (Moura-da-Silva et al., 1995), Cr-IV-1 de *Calloselasma rodhostoma* (Bonfim et al., 2008), 6-1 e 6-2 isoformas da fração BthTX-II de *Bothrops jararacuçu* (Ponce-Soto et al., 2006), BmjeTX-I e BmjeTX-II isoformas PLA<sub>2</sub> de *Bothrops marajoensis* (Ponce-Soto et al., 2010) e BmTX-I PLA<sub>2</sub> de *Bothrops moojeni* (Calgaroto et al., 2008). Os espaços são inseridos nas sequências para atingir a máxima homologia.

### 4.3. Estudos de atividade cinética da BtTX-II

Para o estudo das características cinéticas, é necessária a obtenção de parâmetros cinético-enzimáticos da enzima a ser estudada ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) para o substrato cromogênico sintético, tendo em vista a alta dificuldade de se obterem os substratos naturais em apreciáveis quantidades e graus de pureza aceitáveis. Portanto, a seleção das condições adequadas para seu ótimo desempenho na catálise enzimática nos daria conhecimento de como as enzimas trabalham e permite prever o comportamento das enzimas em organismos vivos.

O efeito do pH na atividade enzimática da fração BtTX-II mostrou uma maior atividade PLA<sub>2</sub>. Para esta toxina ocorre entre pHs 7 e 8, sendo inativa a pHs maiores de 9 e menores do que 7. Os pHs extremos podem causar alteração nas cargas da enzima, provocando modificações na estrutura tridimensional. Isso pode causar influência na interação da enzima com o substrato e, conseqüentemente, a perda da atividade enzimática. Em relação ao efeito da temperatura na atividade enzimática da BtTX-II, revelou-se a temperatura ótima estar próxima a 37°C, conforme ilustrado na Figura 16D, mas aos 40 e 45 °C ainda manteve uma moderada atividade enzimática. Esses achados indicaram que a força de interação da toxina com seu substrato cromogênico diminuíram nas temperaturas menores de 35°C, sugerindo que a interação baseada apenas na carga elétrica é muito fraca (Cavalcante et al., 2005).

O efeito da concentração de substrato na atividade PLA<sub>2</sub> de BtTX-II sobre o substrato 4-nitro-3-(octanoyloxy) ácido benzoico (4N3OBA) mostrou que esta fração apresenta um comportamento com tendência alostérica a baixas concentrações no início da curva do gráfico velocidade/substrato (Figura 16A). Além disso, foram determinados os valores da constante de Michaelis ( $K_m$ ) e a velocidade máxima ( $V_{máx}$ ) a partir do gráfico duplo recíproco de Lineaweaver-Burk da fração BtTX-II (Figura 16B). Para facilitar a visualização dos parâmetros e determinação de tais valores por interpolação gráfica, esses dados foram plotados no programa Origin (OriginPro 8 SR0, Origin Lab. Corporation). Nestas condições o valor da constante  $K_m$  é 0,1683 mM e  $V_{máx}$  0,1154 nmoles/mg/min.

O efeito inibitório das crotapotinas sobre a atividade da PLA<sub>2</sub> foi obtido, pela incubação da PLA<sub>2</sub> purificada, PLA<sub>2</sub> e crotapotinas (Cdt F5, Cdt F7, Cdcól F3 e Cdcól F4), em uma razão de 1:1. Em todos esses casos, sob nossas condições experimentais, a PLA<sub>2</sub> com sua respectiva crotapotina mostrou uma diminuição significativa com Cdt F5 foi 34.44712 %, Cdt F7 foi

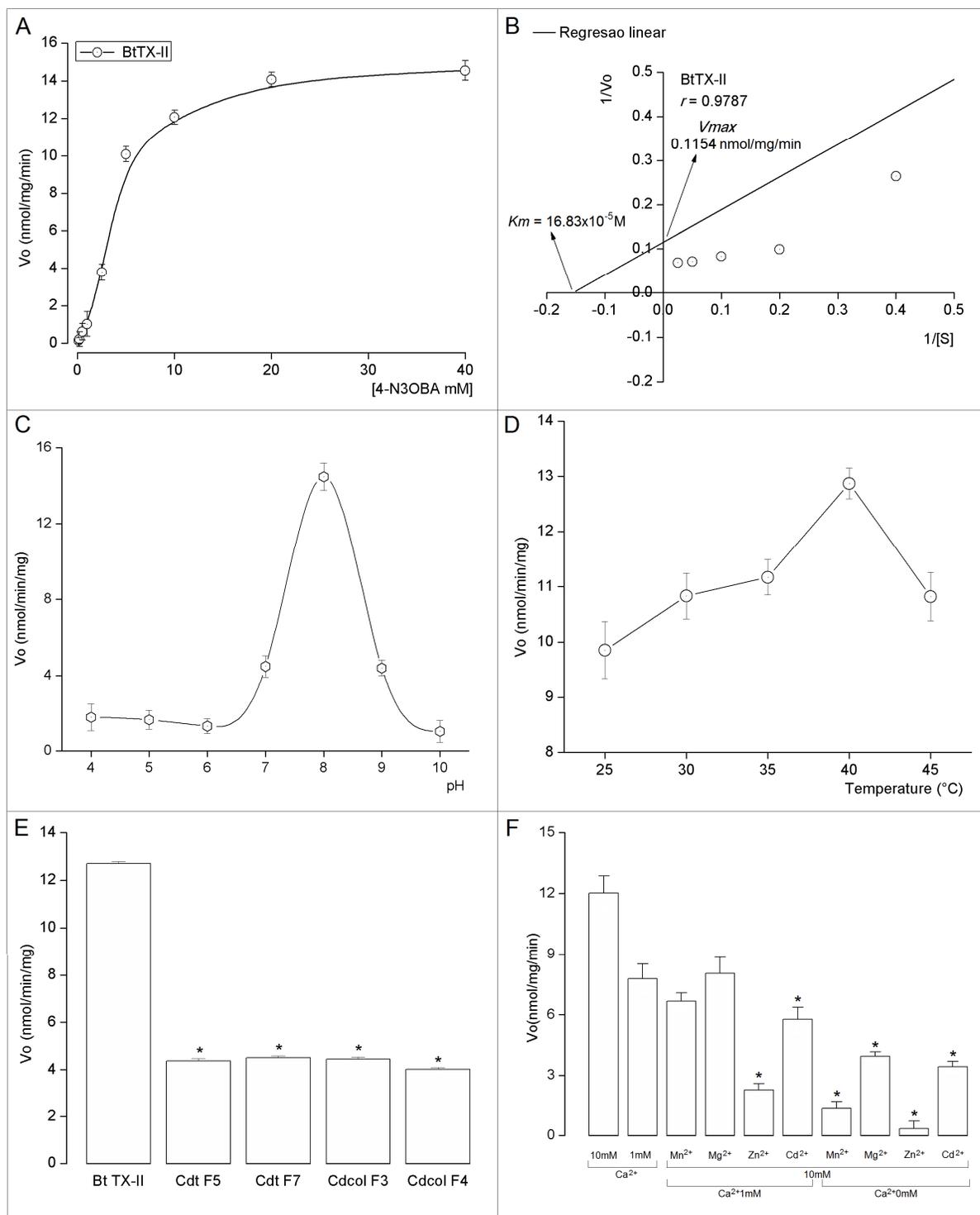
35.45496 %, Cdc01 F3 foi 34.96438 % e Cdc01 F4 foi 31.59397 % respectivamente, da atividade PLA<sub>2</sub> com o substrato cromogênico utilizado (Figura 16E).

Também foi verificada a atividade enzimática da fração BtTX-II na presença de alguns íons divalentes, tais como Mn<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> na concentração de 10mM incubados na ausência e presença de Ca<sup>+2</sup> na concentração de 1 mM (Figura 16F).

Os resultados mostraram a influência dos íons divalentes na atividade fosfolipásica. BtTX-II exibe dependência de Ca<sup>+2</sup>, porém precisa de baixas concentrações de Ca<sup>+2</sup> para ter uma atividade total. Observa-se uma diferença significativa de atividade enzimática entre as concentrações 1 e 10 mM de Ca<sup>+2</sup>.

A mudança completa de Ca<sup>2+</sup> 10mM para Mg<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> e Zn<sup>+2</sup> reduziu significativamente a atividade fosfolipásica (67,21%, 71,48%, 88,84% e 97,14% respectivamente), quando comparado com atividade PLA<sub>2</sub> padrão (10mM). Mas, em presença de baixas concentrações de Ca<sup>+2</sup> (1mM) mais a adição dos íons Mg<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> e Cd<sup>+2</sup>, individualmente, reduziram significativamente a atividade fosfolipásica (33,04%, 44,53% e 51,97%, respectivamente) para níveis similares aos observados somente com Ca<sup>+2</sup> na concentração de 1mM (35,32%), e foi inibida significativamente com o íon Zn<sup>+2</sup> (80,97%).

O íon Zn<sup>+2</sup> (10mM) com 1mM de Ca<sup>+2</sup> e na ausência de Ca<sup>+2</sup> resultou em inibição quase completa da enzima.

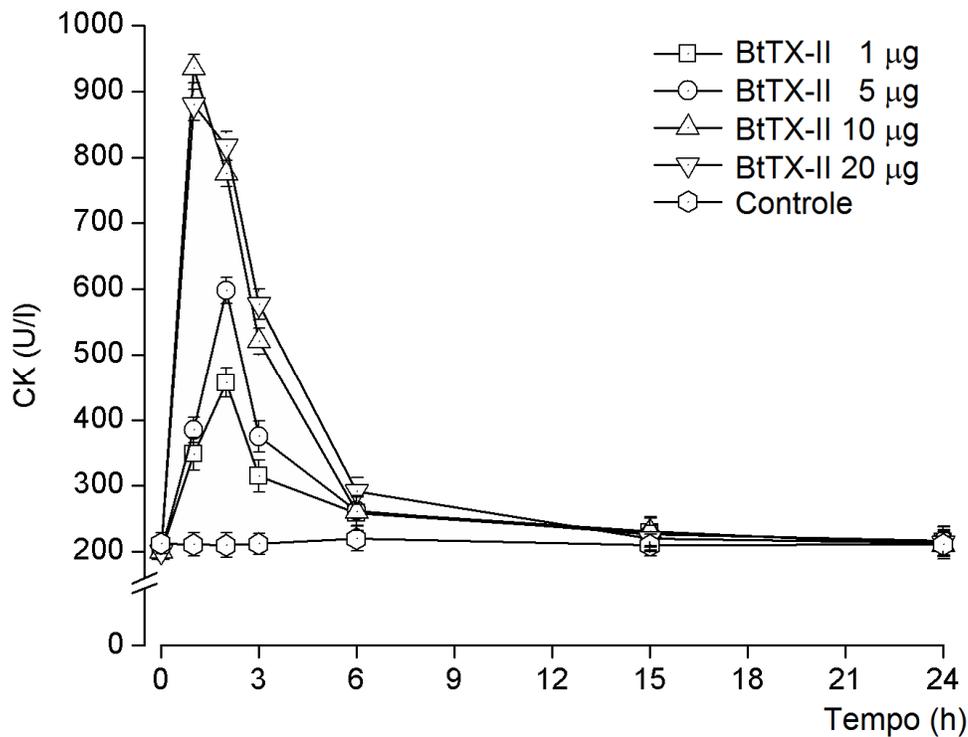


**Figura 16.** (A) Efeito da concentração do substrato sintético 4N3OBA na atividade PLA<sub>2</sub> de BtTX-II; (B) Detalhes em baixas concentrações de substrato; (C) Efeito da variação de pH sobre a atividade PLA<sub>2</sub> de BtTX-II; (D) Efeito da temperatura sobre a atividade PLA<sub>2</sub> de BtTX-II; (E) Efeito dos inibidores de crotopinas obtidas de serpentes cascavéis sobre a atividade PLA<sub>2</sub>; (F) influência de íons (10 mM cada íon) sobre a atividade PLA<sub>2</sub> de BtTX-II na ausência ou presença de 1 mM Ca<sup>2+</sup>. Os resultados de todos os experimentos representam a média ± SEM de três determinações (\**p*<0.05).

#### 4.4. Caracterização farmacológica da BtTX-II

##### 4.4.1. Atividade miotóxica local “*in vivo*” da BtTX-II

A atividade miotóxica local foi realizada em camundongos, inoculando por via intramuscular com diferentes concentrações da fração (1, 5, 10 e 20 µg) dissolvida em 50 µl de PBS. Os resultados mostram que os níveis de CK plasmáticos aumentaram rapidamente na primeira hora do tratamento, atingindo níveis de  $934,54 \pm 21,24$  U/l e  $879,65 \pm 23,61$  U/l de CK para BtTX-II (10 e 20 µg, respectivamente), para posteriormente retornar aos níveis basais, após 6 a 24 horas (Figura 17).



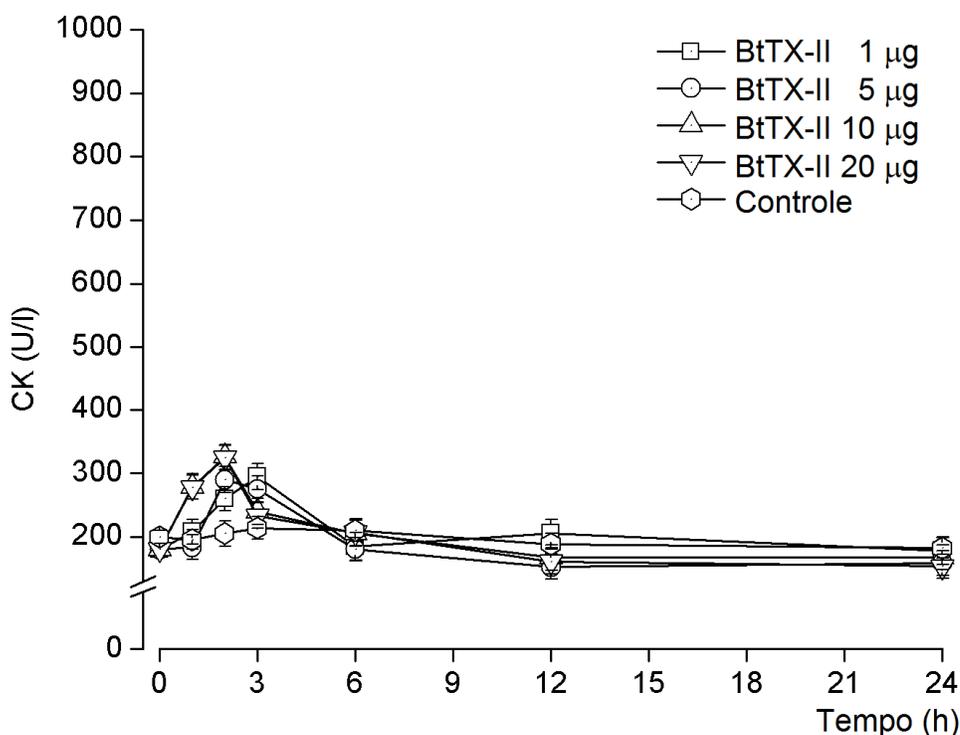
**Figura 17.** Representação gráfica da atividade miotóxica local da BtTX-II (PLA<sub>2</sub>D49) de *Bothriopsis taeniata* em diferentes tratamentos inoculados em camundongos de 20 g de peso. Mostra-se o curso-tempo dos níveis de creatina cinase (CK) aumentados ao longo do tempo depois de terem sido inoculadas (n=5).

#### 4.4.2. Atividade miotóxica sistêmica “*in vivo*” de BtTX-II

Nos estudos de miotoxicidade sistêmica, foram realizados com diferentes tratamentos (1, 5, 10 e 20  $\mu\text{g}$ ) da enzima purificada diluída em 50  $\mu\text{l}$  de PBS e injetados por via intravenosa (i.v.) em camundongos.

A atividade creatina-quinase foi determinada usando 4  $\mu\text{l}$  do plasma, incubado por 3 minutos a 37°C com 200  $\mu\text{l}$  de substrato reconstituído de acordo com o protocolo do kit CK-NAC proveniente do LABORLAB. A atividade foi expressa em unidades por litro (U/l) e definida como a fosforilação de 1  $\mu\text{mol}$  de creatina por minuto, na temperatura de 37°C.

“*In vivo*”, BtTX-II (PLA<sub>2</sub> D49) (Figura 18) não induz efeito miotóxico sistêmico, já que os níveis de CK plasmático ao longo do tempo aumentaram levemente, sendo não significativo nas primeiras duas horas em todos os tratamentos (1, 5, 10 e 20  $\mu\text{g}$ ), mostrando valores basais quando comparados ao controle.



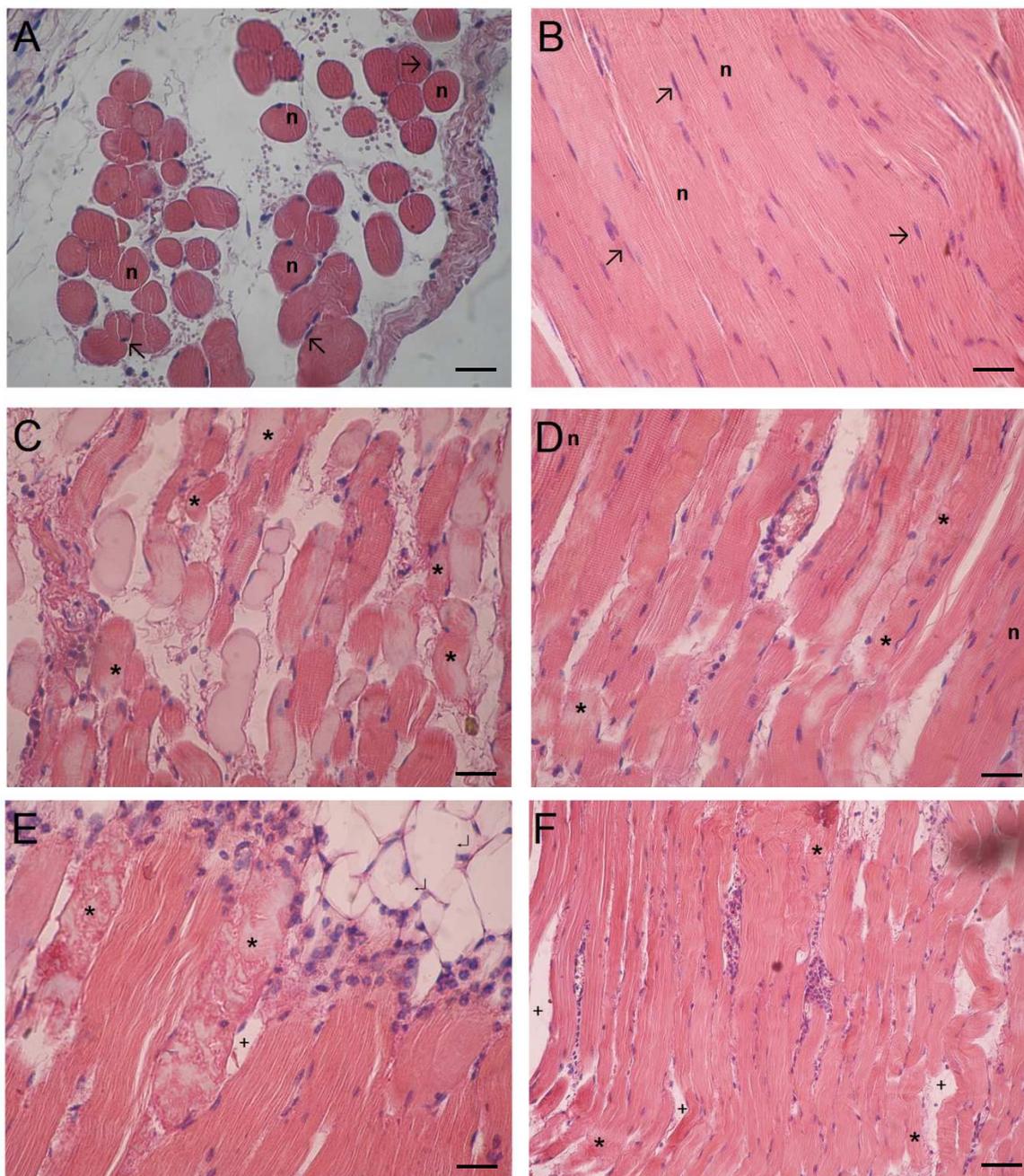
**Figura 18.** Representação gráfica da atividade miotóxica sistêmica da BtTX-II (PLA<sub>2</sub> D49) de *Bothriopsis taeniata*, injetadas via i.v. em camundongos de 20 g de peso. Mostra-se o curso-tempo dos níveis de creatina-quinase (CK) incrementados ao longo do tempo depois que as proteínas foram injetadas (n=5).

#### 4.4.3. Análise histológica “*in vivo*” no músculo gastrocnêmio

A Figura 19 ilustra a microscopia óptica do músculo gastrocnêmio de camundongo. A miotoxicidade *in vivo* foi confirmada através do exame histológico. As fotomicrografias dos cortes histológicos mostraram alterações relevantes induzidas pela BtTX-II nas fibras musculares com mionecrose, escurecimento e desintegração parcial nas suas diferentes concentrações (Figuras 19C, 19D, 19E e 19F), quando comparadas aos tecido controle. Estas mudanças incluíram o aparecimento de células necróticas, edema e infiltrado celular.

Como esperado, a análise histológica do grupo controle não apresentou nenhuma alteração morfológica: as fibras permaneceram íntegras a maioria com formato poligonal, sarcoplasma acidófilo, com estriações e núcleos evidentes localizados na periferia (Figura 19A). As fibras musculares estavam claramente delimitadas por uma delicada camada de tecido conjuntivo (endomísio), e organizadas em fascículos também delimitados por tecido conjuntivo (perimísio) (Figura 19B). Portanto, as modificações histológicas observadas são decorrentes da ação da toxina inoculada.

Os músculos expostos a BtTX-II PLA<sub>2</sub>D49 apresentaram diferentes graus de danos musculares após 3h de contato com a preparação nas concentrações respectivas (5 e 10 µg). As alterações mais evidentes foram fibras quebradas, edema entre as fibras, áreas do citoplasma desprovidas de miofibrilas e observa-se infiltrado inflamatório. Importante é que não se observa hemorragia em nenhum tratamento (Figura 19C e 19D), nem afeta os vasos sanguíneos, nervos ou membrana basal (Figura 19E e 19F).

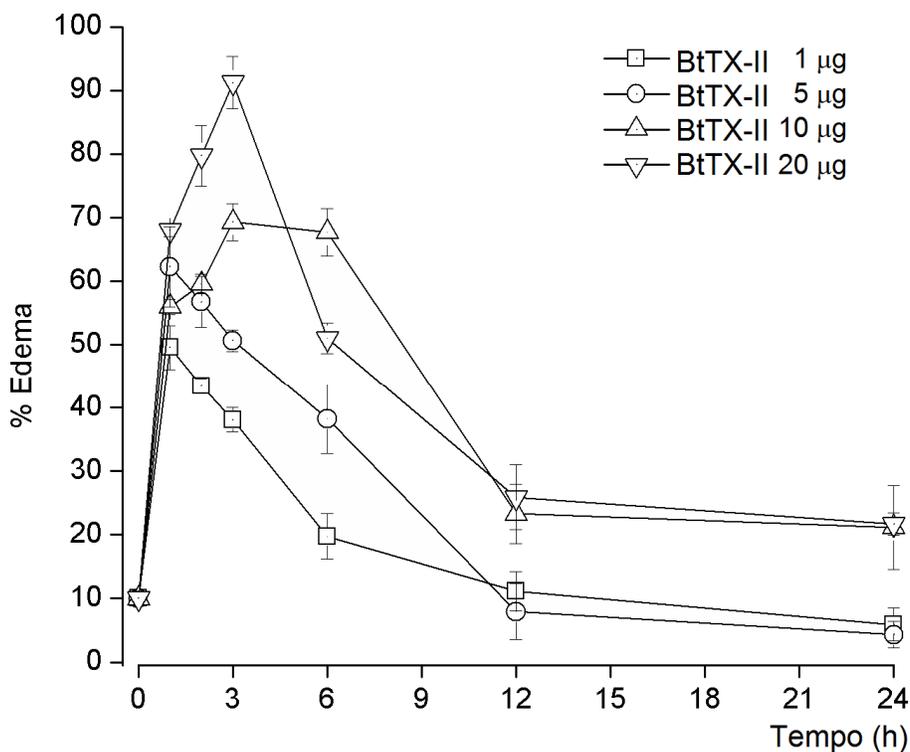


**Figura 19.** Fotos representativas do aspecto morfológico do músculo gastrocnêmio após a injeção com PBS controle em camundongo corte transversal (A), corte longitudinal (B); tratadas com BtTX-II PLA<sub>2</sub>D49 após 180 min de injeção intramuscular (i.m.) nas concentrações de 5 µg/ml no corte longitudinal 40X (C e D) e 10 µg/ml nos cortes longitudinais 40X (E) e 20X (F). Notar que há preservação do perfil poligonal das células nos controle no corte transversal (n), no corte longitudinal fibras integras normais são preservadas (n) e nos músculos tratados a presença fibras musculares necróticas (\*), tecido conjuntivo (∟) com desorganização evidente de material miofibrilar. Infiltrado polimorfonuclear e edema é indicado pelos espaços aumentados entre células de músculo (+). Barra = 50µm para 40X e 100 µm para 20X.

#### 4.4.4. Atividade edematogênica da BtTX-II

Para a determinação da atividade edematogênica, verificou-se um dos eventos que ocorre neste processo, a formação de edema. Para isso, foi aplicada diferentes concentrações de 1, 5, 10 e 20  $\mu\text{g}$  de proteína purificada que foram dissolvidas em 50  $\mu\text{l}$  de PBS e aplicadas sob a região intraplantar da pata traseira direita de camundongos de 20 g. A pata traseira esquerda recebeu 50  $\mu\text{l}$  de PBS como controle. As leituras foram feitas após 1; 2; 3; 6; 12 e 24 horas de aplicação das toxinas. O edema foi expresso com o percentual de aumento em volume da pata direita com relação à pata esquerda.

BtTX-II induziu edema de maneira dose dependente. Com todas as concentrações utilizadas foi observado um edema significativo em relação à injeção de PBS. A Figura 20 mostra que BtTX-II (PLA<sub>2</sub> D49) com tratamento maior de 20  $\mu\text{g}$  induz edema nas três horas após o tratamento, evidenciando o aumento na permeabilidade vascular no lugar da aplicação das toxinas.



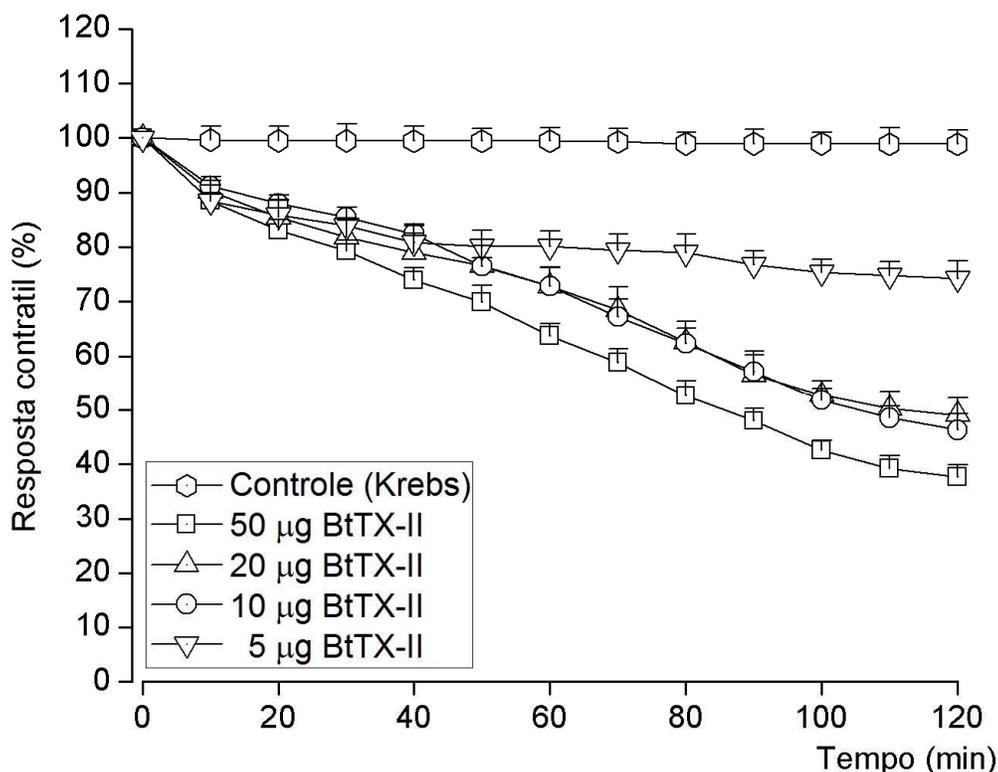
**Figura 20.** Atividade edematogênica da BtTX-II (PLA<sub>2</sub> D49) purificada de veneno de *Bothriopsis taeniata* em camundongos de 20g. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio-padrão de um grupo de 5 animais.

#### 4.4.5. Atividade neurotóxica “*ex vivo*” da BtTX-II

Nos experimentos controle (sem adição da toxina, BtTX-II), não foram observadas alterações na amplitude das contrações musculares e nem na contratatura evocada pela ACh (73,3  $\mu$ M) e K<sup>+</sup> (20 mM) em resposta à estimulação indireta. As preparações se mantiveram estáveis mesmo após várias lavagens (Figuras 21 e 22).

Neste experimento foram testadas as concentrações de 5, 10, 20 e 50  $\mu$ g da BtTX-II purificada de veneno de *Bothriopsis taeniata*. A figura 21 representa o experimento realizado com as preparações de *Biventer cervicis* de pintainho, mostrando um leve efeito neurotóxico “*ex vivo*” nas diferentes concentrações.

Para a concentração de 5  $\mu$ g de BtTX-II, o bloqueio da contração muscular observado aos 120 minutos de incubação foi de  $25,71 \pm 6,83\%$ . Os tempos para atingir um bloqueio de 50% da resposta contrátil foram para as concentrações de 10  $\mu$ g de  $103,62 \pm 2,1$  min, na concentração de 20  $\mu$ g/ml foi  $113,25 \pm 2,4$  min e na concentração de 50  $\mu$ g/ml foi de  $85,48 \pm 2,5$  min (Figura 21).

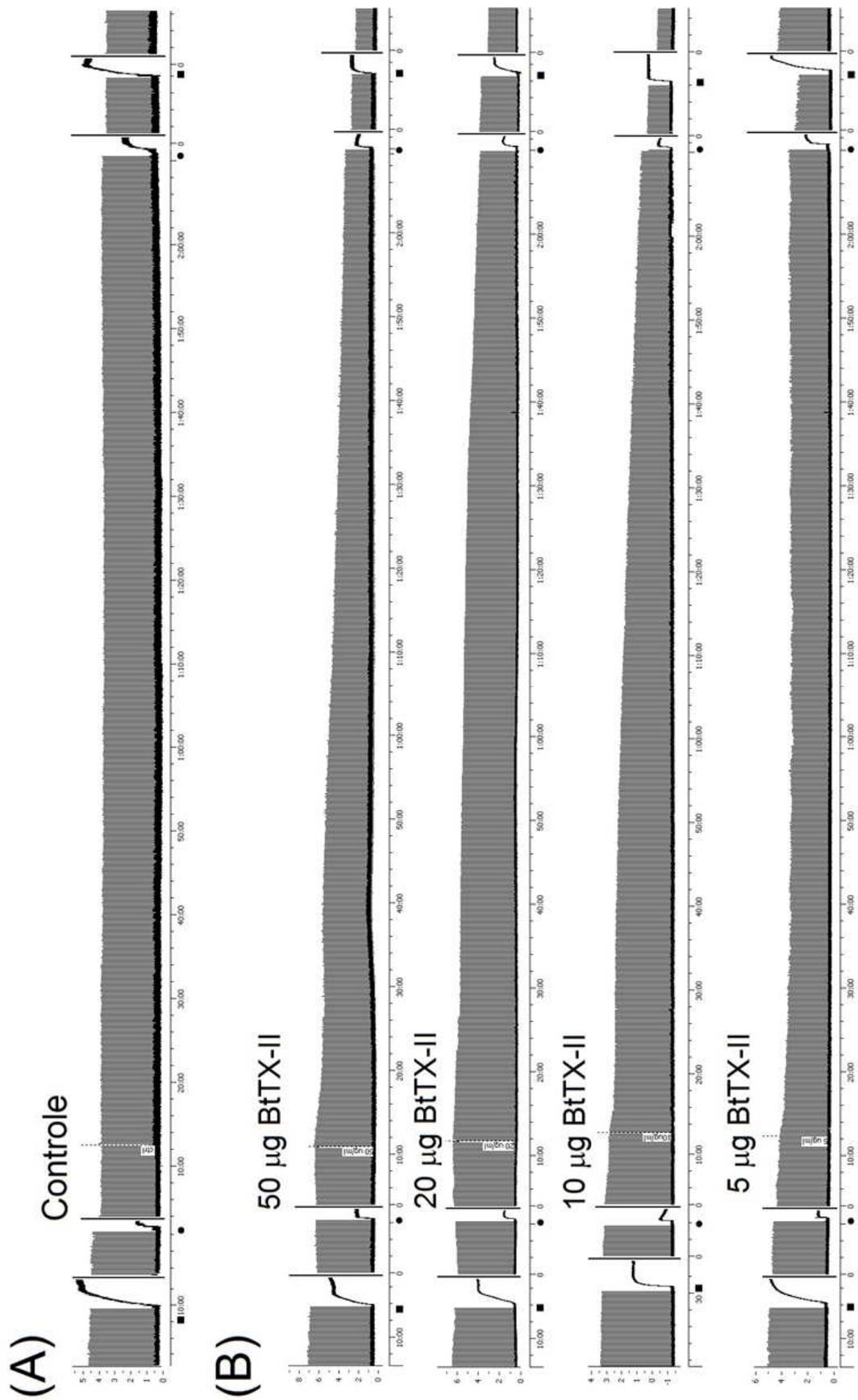


**Figura 21.** Registro gráfico do bloqueio neuromuscular na preparação *Biventer cervicis* de pintainho induzido pelo BtTX-II (Estímulo elétrico indireto), \*:  $p < 0,05$ , comparado com controle Krebs. Os pontos representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 5 experimentos.

#### 4.4.6. Registros miográficos da fração BtTX-II

As concentrações ensaiadas para a fração BtTX-II, de 5, 10, 20 e 50 µg, conforme a figura 22B, evidenciaram um ligeiro efeito neurotóxico mostrando ser dependente da concentração com respeito à preparação controle (Figura 22A).

Na PLA<sub>2</sub> BtTX-II purificada a partir do veneno total da *Bothriopsis taeniata*, houve uma diminuição na resposta à adição de acetilcolina (ACh) 73.3 µM e Cloreto de potássio (KCl) 20mM se comparado às contraturas antes da adição da toxina respectivamente.

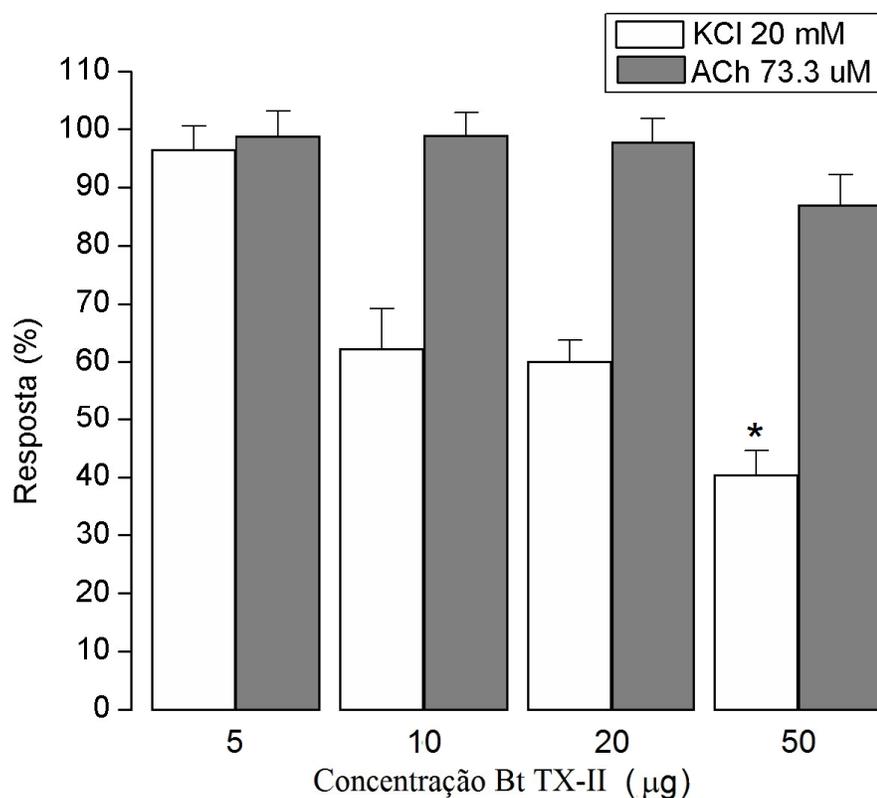


**Figura 22.** Registros miográficos do bloqueio neuromuscular na preparação *Biventer cervicis* de pintainho (Estímulo de campo). Perfis miográficos do controle (A) e dos efeitos da fração BtTX-II (B) na concentração de 5, 10, 20 e 50 µg. Na ausência de estímulo elétrico observar a contração em resposta à adição de ACh (● 73.3 µM) e KCl (■ 20mM) antes e após o tratamento com PLAs3 (Bt TX-II). Em 0 a adição das amostras e n=5 experimentos.

#### 4.4.7. Contraturas induzidas por Acetilcolina (ACh) e Potássio (KCl) em preparações *Biventer cervicis* de pintainho, antes e após a adição da BtTX-II

Os dados das reduções das respostas contraturantes evocadas pela ACh e KCL são mostrados na figura 23 e seu estudo permite a verificação da viabilidade dos receptores nicotínicos e do próprio músculo. Independente da concentração estudada, a BtTX-II afetou levemente a contratura da ACh (73,3  $\mu$ M), mas afetou significativamente a contratura em resposta à adição exógena do KCl (20 mM).

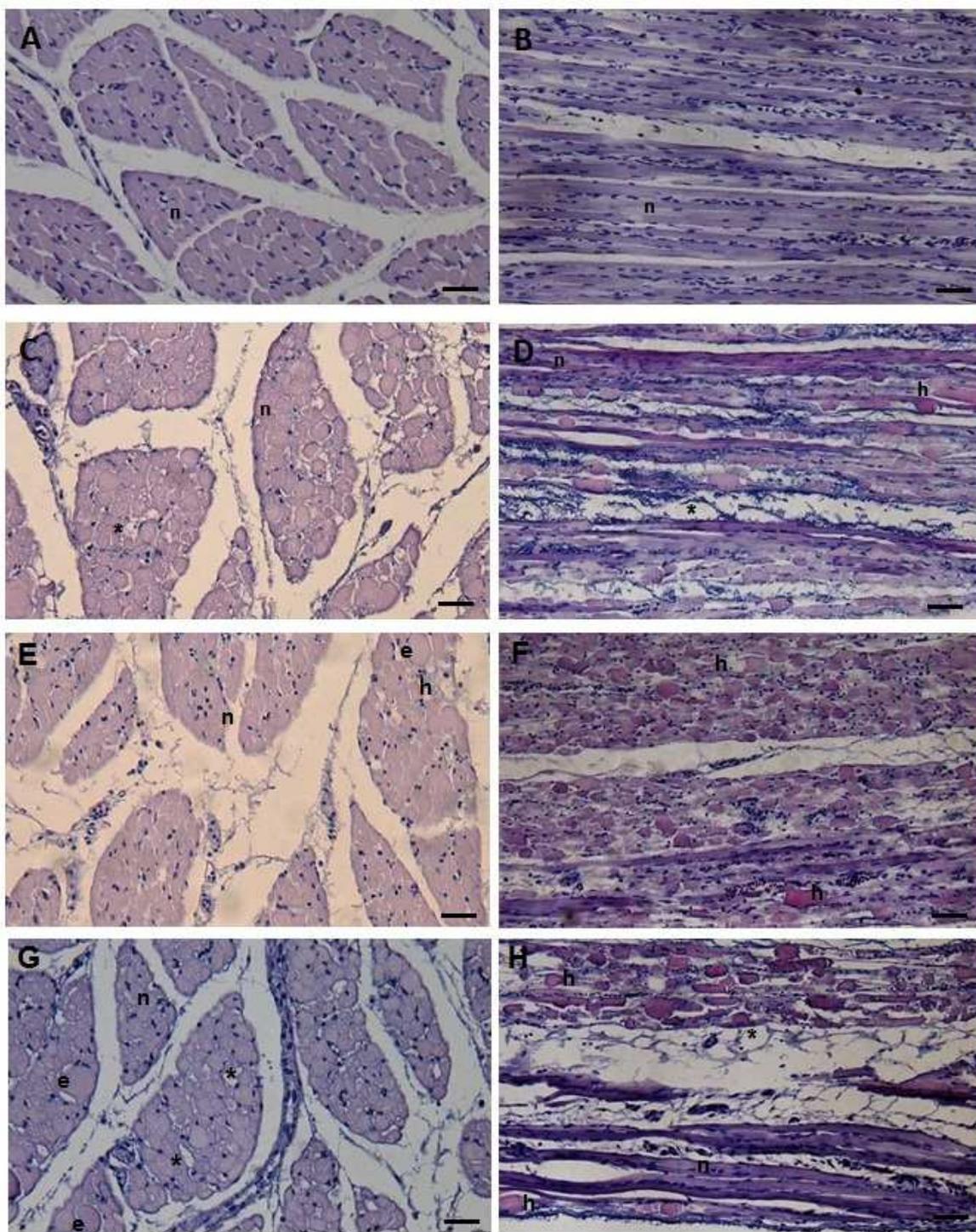
Análises das diferentes concentrações estudadas da enzima (5, 10, 20 e 50  $\mu$ g) mostraram que BtTX-II afetaram a contratura do KCL exógena (73,3  $\mu$ M) em  $3,53 \pm 5,98 \%$ ,  $37,82 \pm 2,98 \%$ ,  $39,96 \pm 6,25 \%$  e  $59,65 \pm 5,77 \%$ , respectivamente, assim como também a contratura em resposta à adição de ACh exógena (20 mM), em  $1,21 \pm 5,69 \%$ ,  $1,04 \pm 6,1 \%$ ,  $2,32 \pm 5,81 \%$  e  $13,04 \pm 4,76 \%$  quando comparado ao controle (Figura 23).



**Figura 23.** Porcentagem de bloqueio da resposta contraturante à acetilcolina (ACh) e ao potássio, na forma de KCl, com as dosagens de 5, 10, 20 e 50  $\mu$ g da PLA<sub>2</sub> (D49 BtTX-II) isolada do veneno de *Bothriopsis taeniata* em músculo *Biventer cervicis* de pintainho. \*:  $p < 0,05$ .

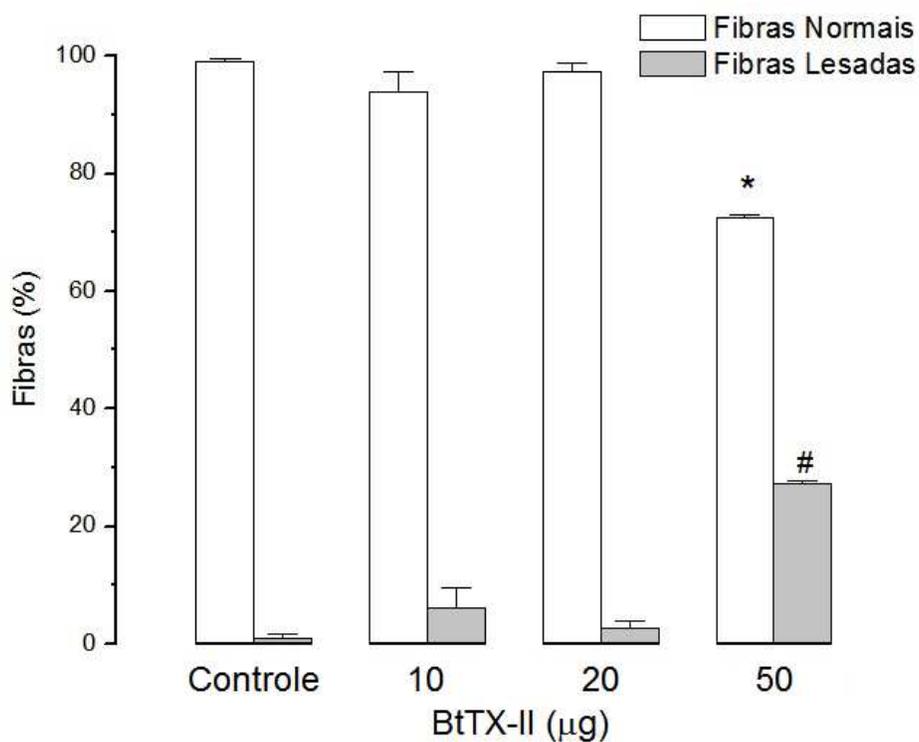
#### 4.4.8. Análise histológica quantitativa “*in vitro*”

A Figura 24A e 24B mostram secções transversais e longitudinais (2  $\mu\text{m}$ ) do músculo *Biventer cervicis* mantidos em solução Krebs (Controle) apresentaram  $99,0 \pm 0,6 \%$  de fibras musculares, que mantiveram-se com aparência normal, verificando-se uma morfologia inalterada, com aspecto poligonal, membrana basal íntegra, miofilamentos presentes e núcleos periféricos semelhantes aos descritos na literatura. No entanto, o tratamento com a fração BtTX-II nas concentrações de 10  $\mu\text{g}$  e 20  $\mu\text{g}$  não apresentaram diferenças significativas e foram observados que  $6,1 \pm 3,4 \%$  e  $2,6 \pm 1,3 \%$  das fibras musculares apresentaram danos morfológicos, sendo a maioria destas “ghost fibers”, as quais apresentam ausência total de miofilamentos, porém lâmina basal intacta (Figura 24C-D e 24E-F). Uma considerável porcentagem de fibras tratadas com 10  $\mu\text{g}$  ( $93,9 \pm 3,4 \%$ ) e 20  $\mu\text{g}$  ( $97,4 \pm 1,3 \%$ ) se mostrou inalterada, apresentando morfologia semelhante à observada no grupo controle (Figura 25). Os músculos *Biventer cervicis* tratados na concentração de 50  $\mu\text{g}$  da fração BtTX-II apresentaram  $27,4 \pm 0,3 \%$  de fibras alteradas, sendo a maior parte destas fibras hipercontraídas; e  $72,6 \pm 0,3 \%$  das fibras apresentou morfologia normal (Figura. 24G e 24H; Figura 25).



**Figura 24:** Corte transversal (A) e longitudinal (B) de músculo *Biventer cervicis* de pintainho tratados com solução Krebs (controle). Note a morfologia íntegra das fibras musculares (n). Tratados com 10 µg de BtTX-II no corte transversal (C) e corte longitudinal (D); com 20µg de BtTX-II, no corte transversal (E) e corte longitudinal (F), e músculos tratados com 50 µg de BtTX-II, seção transversal (G) e seção longitudinal (H) apresentaram,  $27,4 \pm 0,3\%$  de fibras alteradas, sendo a maior parte destas fibras hipercontraídas; e  $72,6 \pm 0,3 \%$  das fibras apresentou morfologia normal. Observe fibras alteradas entre as fibras com morfologia íntegra (n). Note a presença de fibras edemaciadas (e), hipercontraídas (h) e “ghost fibers” (\*). Barra = 50µm.

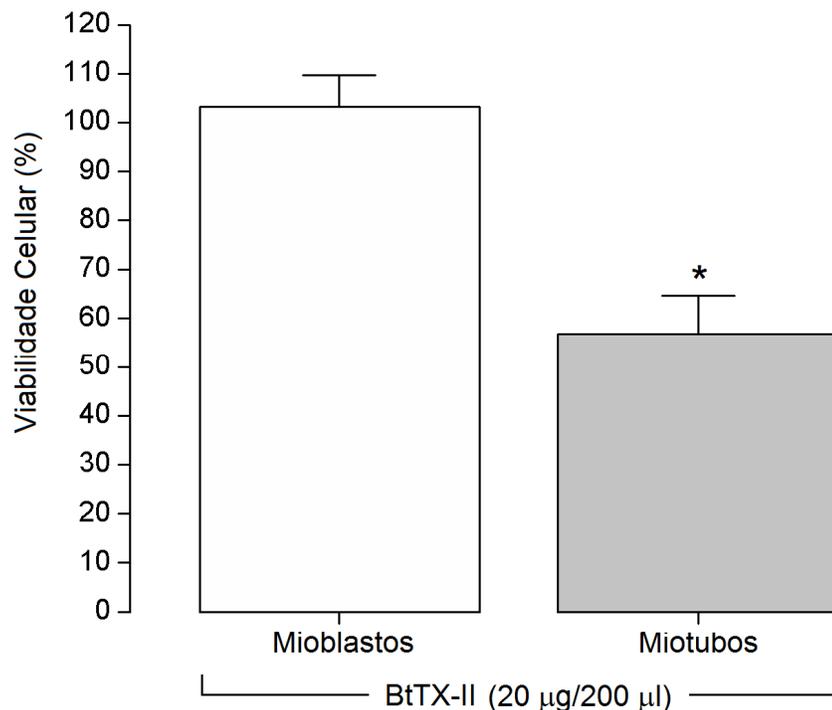
Como ilustrado na Figura 25, os músculos expostos à ação da BtTX-II PLA<sub>2</sub>D49 apresentaram um aumento na porcentagem da fibras lesadas, principalmente na concentração maior (50 µg), quando comparados ao controle. Não se observaram diferenças entre os grupos tratados com as concentrações menores (10 e 20 µg).



**Figura 25:** Os valores apresentados correspondem à porcentagem de fibras alteradas e íntegras em toda a área do corte transversal do músculo *Biventer cervicis* controle e tratados com as concentrações de 10 µg, 20 µg e 50 µg da fração BtTX-II. \*:  $p < 0,05$  em relação ao controle; #:  $p < 0,05$  em relação a 10µg.

#### 4.4.9. Atividade citotóxica através do ensaio coloração cristal violeta da cultura celular com BtTX-II

A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio com cristal violeta e a análise deste ensaio foi expressa em porcentagem de viabilidade celular em relação às absorbâncias do seu próprio controle (mioblastos e miotubos). Com uma concentração padrão de 20  $\mu\text{g}$  de toxina (BtTX-II) mostraram que não houve diferenças significativas entre mioblastos tratados com (BtTX-II) e culturas controle. Entretanto, observou-se um efeito citotóxico de  $43,18 \pm 2,18 \%$  em cultura celular de miotubos da linha C2C12 (Figura 26). Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

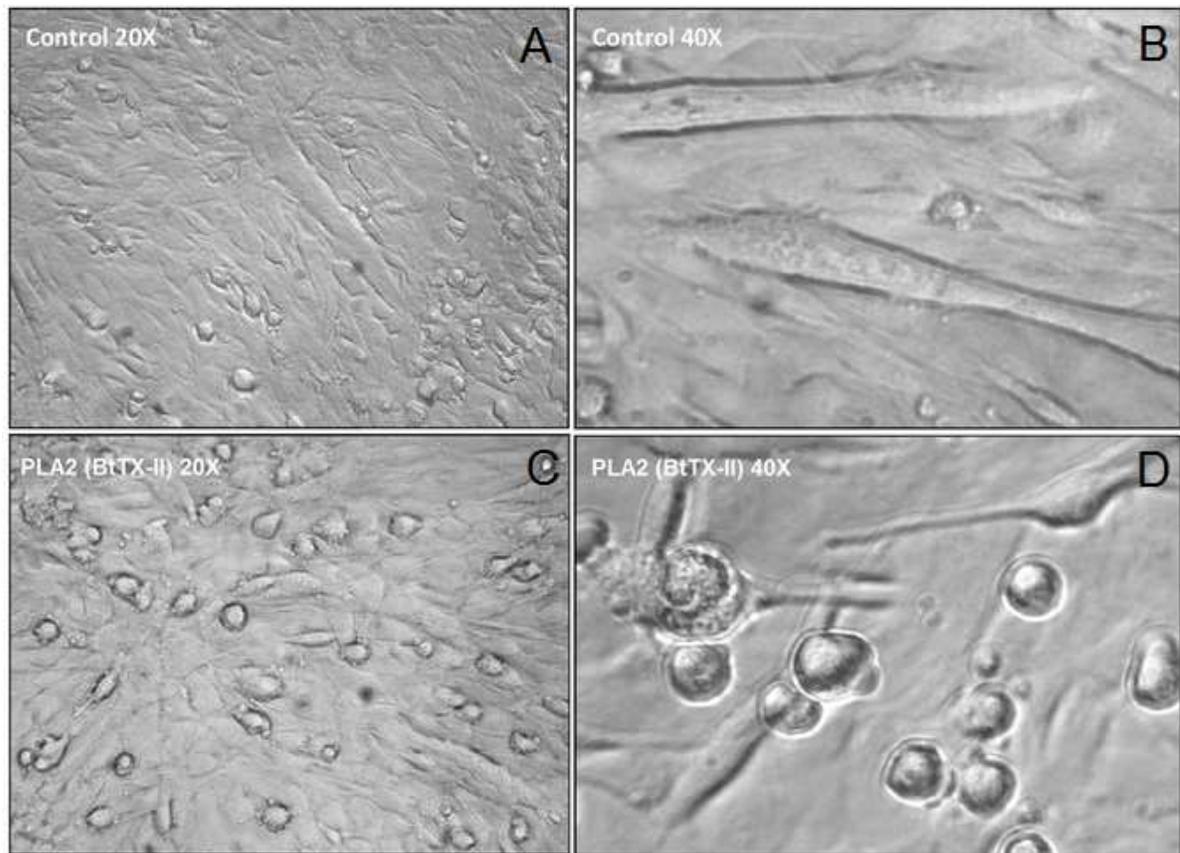


**Figura 26.** Atividade citotóxica da toxina BtTX-II sobre mioblastos/miotubos C2C12, com a concentração de 20 $\mu\text{g}$  diluída em meio de ensaio e logo adicionado às células em crescimento e incubadas durante 9 h em placas de 96 well, em um volume total de 200  $\mu\text{l}/\text{well}$  ( $\sim 2,0 \times 10^4$  células). Resultados são reportados como meia  $\pm$  SD (n=3).

#### 4.4.10. Microscopia óptica do ensaio de citotoxicidade da fração BtTX-II

A Figura 27 (A-D) mostra a comparação entre a viabilidade de células C2C12 no estágio de miotubos tratadas com a miotoxina PLA<sub>2</sub>, BtTX-II (Figura 27C e 27D) com a das culturas controle não tratadas (Figura 27A e 27B), ambas cultivadas em deficiência nutricional (5% FBS). Observou-se que as células tratadas perderam a organização das miofibras de miotubos.

A análise da microscopia óptica das células em cultura nos revelou que, nos grupos tratados com a fração BtTX-II, não houve diferenças significativas na viabilidade celular (avaliado pelo ensaio de cristal violeta) entre mioblastos tratados com a miotoxina PLA<sub>2</sub> (BtTX-II) e células controle, depois de 9 horas de incubação.

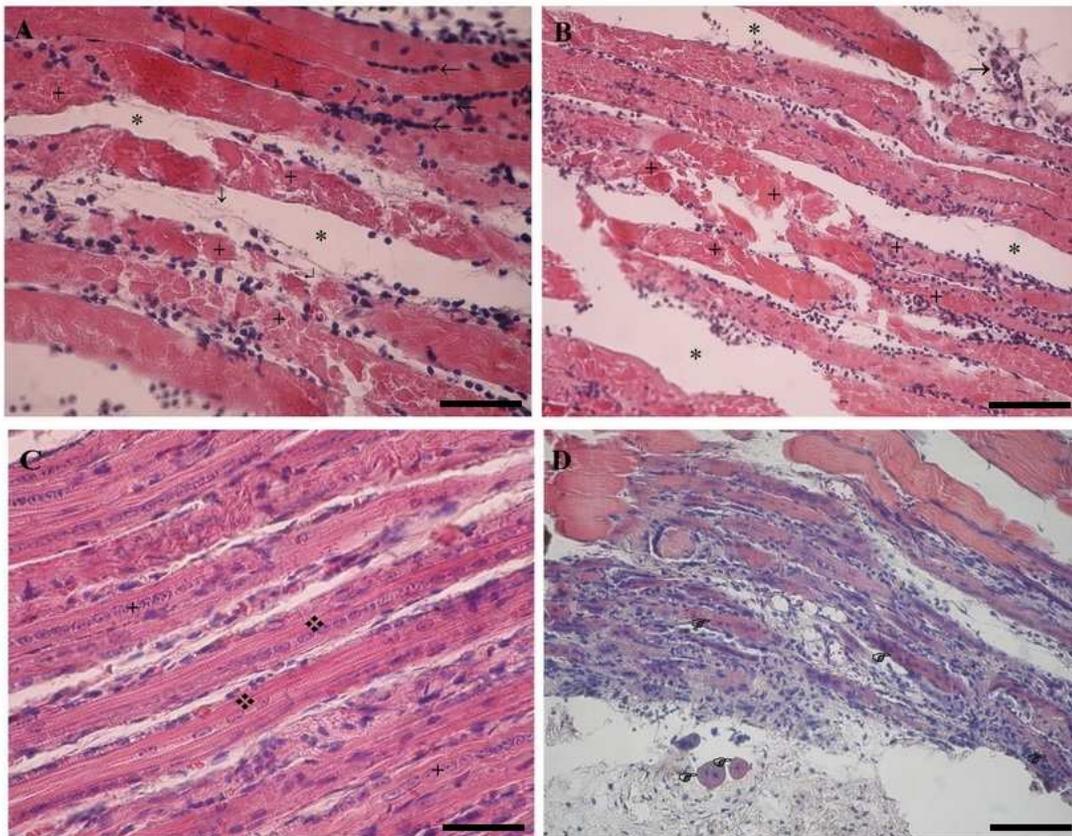


**Figura 27.** Cultura primária de mioblastos consiste na proliferação de células musculares mononucleadas e ainda estão parcialmente indiferenciadas (A) (20X) e quando os mioblastos atingem a confluência e se submetido a condições especiais, estas células entram em processo de diferenciação e se fundem (B) (40X). Imagens de miotubos tratadas com a toxina BtTX-II (20 µg), observasse desarranjo de miotubos organizados (C) (20X), mostra-se miotubos vacuolizados (D) (40X). Todos os ensaios foram feitos em triplicata (n=3).

#### 4.4.11. Perfil de dano e regeneração muscular com BtTX-II

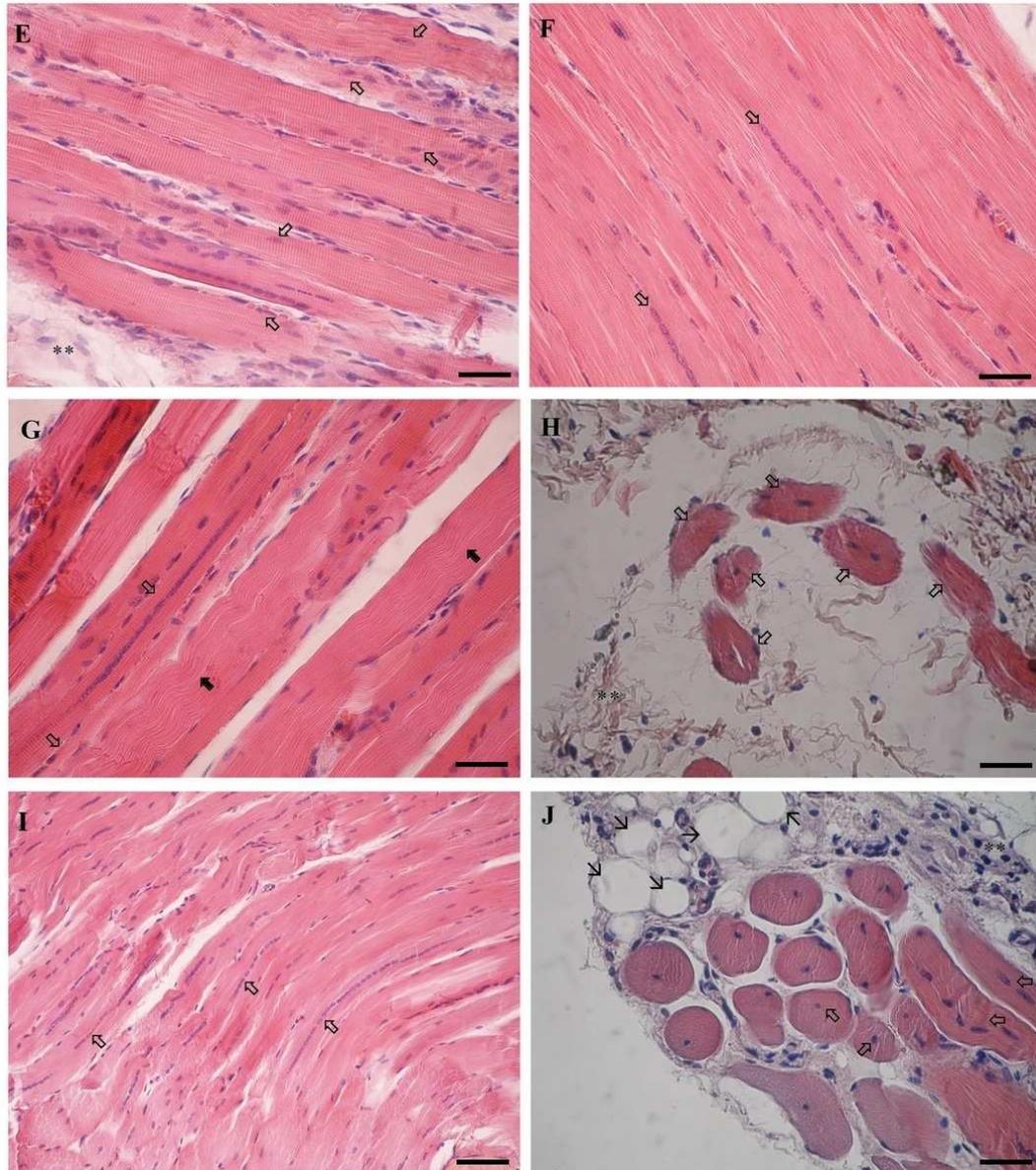
A Figura 28 (A-D) mostra as alterações histológicas que ocorreram no músculo gastrocnêmio de camundongo após a injeção da PLA<sub>2</sub> D49 (BtTX-II) de *Bothriopsis taeniata*, na concentração de 10 µg/50 µl de PBS. Nas primeiras 24h, observou-se, nos músculos injetados com PLA<sub>2</sub> (BtTX-II), um importante infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares, acompanhado de necrose miolítica (fibras lisadas e mortas) e fibrina, além disso, observa-se espaços em branco, o que nos indicou a presença de edema nas figuras 28A e 28B. Foram observados vasos sanguíneos com sua estrutura conservada, mostrando a função seletiva desta PLA<sub>2</sub>.

No período de 7 dias, observaram-se fibras musculares em diferentes estágios de maturação, em alguns casos observaram-se núcleos muito próximos entre eles e outras fibras com separação mais evidente, indicando um tempo de desenvolvimento maior. As fibras em regeneração eram menores, com alguns núcleos dispostos no centro da célula, como pode ser observado na Figura 28C e 28D.



**Figura 28.** Estudo histopatológico da regeneração muscular em cortes longitudinais do músculo gastrocnêmio de camundongo tratados com 10 µg de BtTX-II, corado com Hematoxilina-eosina (HE). (A) 24 horas após a lesão com aumento 40X (← = migração de infiltrado inflamatório), (+ = fibras quebradas), (⊥ = restos de fibrina muscular) e (\* = edema). (B) com aumento 20X (→ = vaso sanguíneo com mobilização de polimorfonucleares). (C) após 7 dias de inoculadas com aumento 40X (+ = muito próximos núcleos um ao outro) e (❖ = separação mais evidente de núcleos). (D) com aumento 20X (⊗ = fibras musculares em regeneração). Barra = 50µm para 40X e 100 µm para 20X.

Após 14 dias observaram-se fibras regeneradas com seus núcleos na posição central. Conforme transcorre o tempo de exibição, os núcleos capturam a coloração da eosina, ao invés da hematoxilina, assim notam-se os núcleos das células regeneradas mais azuis nas fibras regeneradas de 14 dias (Figura 28E e 28F). No 21º dia, ainda se observaram fibras de regeneração com menor diâmetro em comparação com as fibras normais (figura 28G e 28H), e no 28º dia, também apresentou fibras em regeneração (Figura 28I e 28J).



**Figura 29.** Fotomicrografias de cortes longitudinais do músculo gastrocnêmio de camundongo tratados com 10 µg de BtTX-II, corado com HE. (E) e (F) 14 dias de tratamento com aumento 40X (⊞ = fibras regeneradas musculares com estriamentos transversais), (\*\* = tecido conjuntivo), (⊞ = fibras regeneradas com núcleos na posição central). (G) corte longitudinal e (H) corte transversal após 21 dias de tratamento com aumento 40X (⊞ = fibras normais não regeneradas). (I) corte longitudinal com aumento 20X e (J) corte transversal após 28 dias de tratamento com aumento 40X (⊞ = ainda com fibras em regeneração) e (↘→ = tecido conectivo especializado). Barra = 50µm para 40X e 100 µm para 20X.

## V. Discussão

### 5.1. Caracterização bioquímica e estrutural da fração BtTX-II

Entender as características das enzimas PLA<sub>2</sub>s de venenos de serpente é uma preocupação e um foco de estudo para investigadores de toxinas. Estas investigações podem auxiliar a produção efetiva de antivenenos terapêutico, e a descoberta sobre o papel destas enzimas nos envenenamentos. Uma das características estruturais mais importantes das PLA<sub>2</sub>s é a presença de ácido aspártico (D49) nas PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativas. Nessa região molecular localiza-se o sítio onde este resíduo é um dos responsáveis pela ligação com o cálcio, que é um cofator essencial da atividade enzimática. A conservação dos segmentos 44-50 e 28-32 representam as regiões mais diretamente envolvidas com a função catalítica. Estas regiões moleculares também poderiam ter uma grande importância estrutural e funcional nas PLA<sub>2</sub>s neurotóxicas com atividade catalítica (Arni e Ward, 1996).

Como descrito previamente, por meio de dois passos cromatográficos, foi possível purificar uma nova fração denominada BtTX-II. Além de ser o procedimento simples e rápido, a utilização dos tampões bicarbonato de amônia ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Sephadex G-75) e acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN) (HPLC-FR) tem a vantagem, por ser bastante volátil, de ser facilmente eliminado no processo de liofilização, deste modo, não sendo necessário submeter as frações à etapa de dessalificação.

Resultados das etapas do processo de purificação da PLA<sub>2</sub> D49 BtTX-II isolada mostraram uma alta atividade específica (51303,31 U/mg), cerca de 92,30 vezes mais do que o veneno total (Tabela 1). Este aumento na atividade específica da PLA<sub>2</sub> pode ser devido à remoção de outros componentes sinergisticamente interativos do veneno total. O rendimento neste processo foi de 58,90 % de BtTX-II; valores que estão de acordo como os obtidos por Fuly et al., 2002, que utilizou a mesma combinação de etapas (filtração gel e HPLC-FR) purificando a PLA<sub>2</sub> ácida denominada LM-PLA<sub>2</sub>-II proveniente do veneno de *Lachesis muta*.

Para confirmar o grau de pureza da fração BtTX-II, foi utilizado o mesmo sistema cromatográfico onde um único pico foi observado (Figura 10), sendo este o responsável pelo efeito miotóxico local (Figura 17). Também foi utilizada uma eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida (12,5%) (Figura 11), que revelou em condições não redutoras uma única banda proteica, e quando reduzida com DTT, também demonstrou a presença de uma única banda de massa molecular de ~14 kDa. Esses resultados estão de acordo com os dados encontrados para

outras fosfolipases descritas na literatura (Gutiérrez e Lomonte,1995; Arni e Ward, 1996 e Gutiérrez et al., 2008).

A espectrometria de massa por MALDI-TOF confirmou a pureza da proteína e mostrou que BtTX-II possui uma massa molecular de 13889,98 Da (Figuras 13). Esse dado é uma característica das PLA<sub>2</sub> provenientes de veneno de serpentes (Kang et al., 2011). A atividade fosfolipásica mostrou ser maior para a fração purificada, BtTX-II, quando comparada com o veneno total e a fração do sephadex G-75, Bt-III. Assim, temos que, para o veneno total, a velocidade de reação foi  $2,185 \pm 0,078$  nmoles/min (Figura 12), e para a isoforma PLA<sub>2</sub> foi de  $12,075 \pm 0,138$  nmoles/min. Este experimento reforça o fato de considerarmos a isoforma BtTX-II como Asp49.

Enzimas PLA<sub>2</sub>s básicas de veneno de serpentes geralmente mostram o comportamento clássico de Michaelis-Menten, hidrolisando substratos sintéticos na posição 2 e atacando preferencialmente substratos em estado micelar (Breithaupt, 1976). As PLA<sub>2</sub>s são enzimas interfaciais que hidrolisam fosfolipídios em capas lipídicas micelares ou monoméricas, apresentando grandes aumentos na sua atividade catalítica (até 10000 vezes) quando os fosfolipídios monoméricos agregam-se formando micelas perto da sua concentração micelar crítica (Verheij et al., 1981; Speijer et al., 1996). Isto é devido a uma boa eficiência de catálise interfacial que é promovida fortemente pela presença de moléculas aniônicas anfipáticas dentro da membrana (Schiavo et al., 2000). A atividade PLA<sub>2</sub> foi medida sobre um substrato sintético (o substrato cromogênico ácido 4-nitro-3 octanoiloxi-benzóico), o qual serve como um substrato específico para PLA<sub>2</sub>s provenientes dos venenos de serpentes. O princípio do método consiste na liberação de um produto cromogênico (ácido 4-nitro-3 hidroxibenzóico) a partir da hidrólise do substrato pela enzima. Este ensaio é utilizado para detectar a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub> cataliticamente ativas do tipo Asp49 (D49).

Os estudos cinéticos compreendem experimentos realizados que incluem: medida da atividade fosfolipásica, efeito da concentração de substrato na atividade PLA<sub>2</sub>, efeito do pH, temperatura, de íons divalentes e medida da atividade inibitória das crotapotinas. A literatura descreve que as PLA<sub>2</sub> são altamente estáveis e muito resistentes ao calor, ácidos e uréia, mas sua atividade catalítica é diminuída em valores de pHs baixos e altos. Quando são utilizados substratos micelares, a sua atividade catalítica máxima ocorre em pH 7 – 8 e 35 – 45 °C de temperatura (Holzer e Mackessy, 1996; Breithaupt, 1976). Tais dados estão de acordo com a atividade PLA<sub>2</sub> da BtTX-II, que apresenta uma atividade enzimática ótima com o pH 8.0 e

temperatura na faixa de 35 até 44 °C (Figura 16C e 16D) com o substrato cromogênico denominado ácido 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoico (4N3OBA) (Holzer e Mackessy, 1996). Pode ser atribuído ao pH básico o aumento da atividade patológica da enzima PLA<sub>2</sub> nos envenenamentos, pois produz uma elevação da reação enzimática através de uma melhor ação do mecanismo catalítico (ataque mediado pela base geral). O ataque mediado pela base geral sobre a ligação de quebra através do envolvimento de uma molécula de água conservada (Kang et al., 2011), o qual serve como um nucleófilo para substratos produtivamente ligados, foi descrito por Scott e Sigler (1994). Este ataque é o primeiro entre os três passos essenciais na catálise de enzimas PLA<sub>2</sub>, como deduzida pelos estudos cristalográficos na enzima. O aumento na temperatura do corpo das vítimas mordidas pela serpente sobre a temperatura fisiológica pode ser uma condição favorável para PLA<sub>2</sub> exercer sua função hidrolítica efetivamente, já que essas temperaturas podem favorecer mudanças na estrutura e fluidez da membrana (Lomonte et al., 1994). Tais parâmetros em PLA<sub>2</sub>s com atividade ótima são semelhantes àqueles informados para PLA<sub>2</sub>s dos venenos de *L. muta* e *N. naja* (Fuly et al., 2002; Shashidaramurthy e Kemparaju, 2006).

A atividade PLA<sub>2</sub> de BtTX-II foi estudada usando diferentes concentrações do substrato cromogênico 4N3OBA, o qual evidenciou ser esta uma enzima monomérica com comportamento tipo sigmoidal discreto (Figura 16A), principalmente a baixas concentrações de substrato 4N3OBA, fato que concorda com os resultados obtidos por Calgarotto et al. (2008), para a PLA<sub>2</sub> nomeada BmTX-I isolada de veneno de *Bothrops moojeni*, e Bonfim et al. (2006), para a PLA<sub>2</sub> Bj-V isolada de veneno de *Bothrops jararacussu*, todos utilizando o mesmo substrato aqui descrito. A ligação com o substrato induz mudanças de conformação, de modo que, ao final do ciclo catalítico, a enzima mantém uma alta afinidade pela seguinte molécula de substrato, sugerindo que essa cooperatividade positiva obedece a um mecanismo mnemônico (Kamata et al., 2004). Como vemos, as PLA<sub>2</sub>s de venenos crotálicos mostram comportamento similar às PLA<sub>2</sub> D49 presentes nos venenos botrópicos, como é o caso nos estudos cinéticos da PLA<sub>2</sub> BtTX-II de *Bothriopsis taeniata* (Beghini et al., 2000; Ponce-Soto et al., 2002). As PLA<sub>2</sub>s botrópicas e crotálicas apresentam diferenças estruturais e funcionais, mas possuem cinética enzimática com tendência alostérica.

Apesar de não ser requerida para a ligação da enzima na interface, a presença de um íon cálcio divalente (Ca<sup>2+</sup>) nas PLA<sub>2</sub>s procedentes do veneno de serpentes é um cofator essencial para a ligação do substrato no sítio catalítico e para o processo enzimático das fosfolipases A<sub>2</sub>

(Berg et al., 2001). BtTX-II mostrou ser completamente dependente de  $\text{Ca}^{+2}$  (Figura 16F) na concentração de 1 mM apenas para que ocorra a catálise (Breithaupt, 1976; Holzer e Mackessy 1996). Observa-se uma diminuição da atividade enzimática entre 10 e 1 mM de cálcio, o que concorda com os resultados obtido por Shiomi et al., (1998) e Ponce-Soto et al., (2002). No entanto, foram testados com a adição de outros íons divalentes ( $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$ ) (10mM) na presença (1mM) e ausência de  $\text{Ca}^{+2}$  com o intuito de se verificar a existência de alguma outra dependência para uma atividade ótima, apesar de serem divalentes não contribuíram para a atividade catalítica e ainda foram capazes de reduzir esta atividade, nas concentrações utilizadas. A atividade enzimática com  $\text{Zn}^{+2}$  foi marcadamente reduzida sem a presença de cálcio, indicando-nos que este cátion não pode substituir o  $\text{Ca}^{2+}$ . Com os resultados demonstrados na Figura 16F percebe-se que as enzimas tiveram alguma atividade  $\text{PLA}_2$ , embora pequena, talvez pelo fato destes íons tiver um raio atômico próximo ao do cálcio. Dos íons testados na presença de cálcio (1 mM) somente o  $\text{Mn}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (10 mM) garantiram uma atividade catalítica moderada para a  $\text{PLA}_2$  BtTX-II.

Estudos realizados por Beghini e colaboradores (2000) observaram o mesmo para  $\text{PLA}_2$  do veneno crotálico (*Crotalus durissus cascavella*). O íon  $\text{Ca}^{2+}$  direciona o posicionamento do substrato no sítio ativo da enzima e parece que esse arranjo do sítio catalítico apresenta uma estrutura exclusiva para o  $\text{Ca}^{2+}$ , sugerindo uma modificação provável de conformação da enzima depois de se ligar diferentemente do padrão de cálcio, o que explicaria ou causaria uma diminuição na atividade  $\text{PLA}_2$  na presença de outros íons (Murakami et al., 2006). O requerimento restrito de cálcio é uma característica comum das  $\text{PLA}_2$  de várias fontes (Dennis, 1994; Arni e Ward, 1996) e a BtTX-II mostrou essa característica de dependência de íon  $\text{Ca}^{2+}$  semelhante a outras  $\text{PLA}_2$ s D49.

O teste de atividade inibitória das crotapotinas permitiu verificar que a  $\text{PLA}_2$  BtTX-II encontra-se inibida em torno de 60% frente às crotapotinas estudadas de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus* (Figura 16E). Também não observou diferença entre as diversas crotapotinas, e estes resultados permitem inferir que haja uma crotapotina-like também nos venenos botrópicos, capaz de inibir a atividade catalítica de  $\text{PLA}_2$  D49 (Bonfim et al., 2001).

O estudo de homologia das sequências obtidas da  $\text{PLA}_2$  BtTX-II revelou um nível de conservação dentro da família de proteínas  $\text{PLA}_2$ s de veneno de serpente de origem botrópica (Figura 15). O resultado da análise destas sequências obtidas dos peptídeos de BtTX-II mostrou

que esta enzima apresenta várias características de fosfolipase A<sub>2</sub>, conservando os resíduos chave envolvidos na ligação de Ca<sup>2+</sup> (Tyr28, Gly30, Gly32 e Asp49) e na rede catalítica (His48). O fato de se observarem pequenas diferenças em algumas das sequências dos peptídeos determinados por espectrometria de massa “*in tandem*” não modificaram os efeitos biológicos aqui estudados. Além disso, se a sequência obtida apresentasse um nível de identidade superior a 40% com outra estrutura já conhecida, poderia supor que suas estruturas eram similares e então construir um modelo tridimensional por homologia (Martí-Renom et al., 2000). As PLA<sub>2</sub>s pertencem a uma família de enzimas específica e como cada PLA<sub>2</sub> de um grupo (composta de 15 grupos e muitos subgrupos, segundo Burke e Dennis, 2009) possui homologia sequencial com um alto grau de identidade entre si, este dado nos revela que estas enzimas apresentam posições extremamente conservadas dentro do grupo de PLA<sub>2</sub> e as regiões menos conservadas seriam provavelmente determinantes na diversidade de efeitos farmacológicos exibidos pelas PLA<sub>2</sub>s.

## 5.2. Caracterização farmacológica e morfológica da fração BtTX-II

Neurotoxinas de veneno de serpentes que causam paralisia neuromuscular atuam tanto pré-juncionalmente por bloquearem a liberação de acetilcolina (ACh) quanto pós-juncionalmente por bloquearem os receptores nicotínicos. Estes diferentes mecanismos de ação podem ser diferenciados usando a preparação *Biventer cervicis* de pintainho (BCp), devido a sua forma de inervação (múltipla ou focal). As fibras musculares de pintainhos apresentam inervação múltipla, ou seja, possuem áreas quimiossensíveis ao longo de toda a membrana muscular e, por esse motivo, respondem à ACh adicionada ao banho com uma contratatura (encurtamento do músculo) da musculatura esquelética. (Harvey et al., 1994; Hodgson e Wickramaratna, 2002).

Componentes neurotóxicos dos venenos de serpentes foram mais bem descritos na família Crotalidae. Eles não são capazes de penetrar na barreira hematoencefálica, mas, em condições de profundas alterações do endotélio, podem alcançar o sistema nervoso central (SNC) e originar quadros patológicos até agora não muito esclarecidos (Monterrey, 2001; Rodríguez-Acosta et al., 2003; Montecucco et al., 2008).

No entanto, os venenos, bem como suas toxinas, atuam periféricamente na junção neuromuscular. Assim, estudos têm mostrado que espécies botrópicas possuem efeito neurotóxico “*in vitro*”, como o reportado por Costa et al. (1999) e Oshima-Franco et al., (2004), que evidenciaram que os venenos botrópicos possuem efeitos miotóxico e neurotóxico “*in vitro*”, capazes de bloquear a resposta contrátil na preparação neuromuscular de roedores.

A caracterização neurotóxica feita da enzima de interesse BtTX-II, neste modelo BCp, mostrou que a PLA<sub>2</sub> BtTX-II foi menos neurotóxica quando comparada com PLA<sub>2</sub>s de venenos crotálicos, já que estas últimas levam a um bloqueio de transmissão neuromuscular muito mais rápido (Beghini et al., 2005; Romero-Vargas et al., 2010). Assim, não se pode negar que a BtTX-II do veneno botrópico seja ligeiramente neurotóxica, quando submetida a estímulo elétrico indireto nas concentrações de 10, 20 e 50 µg em 113,54 ± 3,2 min; 106,13 ± 2,4 min e 88,91 ± 2,0 min, respectivamente, sendo os tempos necessários para a obtenção de 50% de bloqueio. Porém, pode-se determinar, assim, um grau moderado de neurotoxicidade “*ex vivo*” pelos valores dos tempos de 50% de bloqueio, evidenciando, além disso, não ser dependente da concentração (Figura 21 e 22).

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

Acetilcolina (ACh), ou pós-juncionalmente, bloqueando os receptores para a ACh. Estes diferentes mecanismos de ação podem ser diferencialmente demonstrados usando-se a preparação *Biventer cervicis* de pintainho (Harvey et al., 1994), sendo esta preparação considerada vantajosa no estudo de venenos e toxinas, quando comparada à preparação nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongo, especialmente quando tal estudo se destina a diferenciar os seus mecanismos de ação pré e/ou pós-juncionais. Em nossos experimentos no modelo *Biventer cervicis* de pintainho, houve leve atividade neurotóxica com a isoforma BtTX-II nas concentrações tratadas.

A resposta ao potássio é indicativa de preservação da membrana de células musculares (Beghini et al., 2000). Os resultados aqui apresentados mostram que o bloqueio parcial na dosagem de 5, 10, 20 e 50 µg da enzima BtTX-II (Figura 21) foi levemente inibido em resposta à acetilcolina (ACh) em 98,76%; 98,96%; 97,68% e 86,96%, acompanhado pela inibição das contraturas induzidas ao potássio (KCl) 96,47%; 62,18%; 60,04% e 40,35% respectivamente (Figura 23). Estes dados mostram que a BtTX-II é uma fração com leve efeito neurotóxico e moderadamente miotóxico.

A resposta a ACh é um indicativo da preservação dos receptores colinérgicos pós-sinápticos. Neurotoxinas ativas pré-sinápticamente são capazes de abolir a resposta contrátil sem afetar a resposta aos agonistas (ACh) colinérgicos (Lewis e Gutmann, 2004). Como a resposta a ACh se manteve antes e após experimento, pode-se sugerir que a BtTX-II é uma miotoxina com atividade neurotóxica de ação pré-sináptica. Estes dados sugerem que a fração BtTX-II do veneno de *Bothriopsis taeniata* tem pouco efeito inibitório na resposta contrátil com a concentração superior de 50 µg e mostrou uma resposta a ACh de 86,96% frente aos receptores pós-sinápticos colinérgicos. BtTX-II causou um moderado dano muscular, o que não impediu a contratura em resposta ao KCl exógeno, portanto a enzima BtTX-II comporta-se como uma miotoxina neurotóxica pré-sináptica.

Alguns pesquisadores consideram como feito neurotóxico aquele que afeta o SN somático, por exemplo, a ação neurotóxica do veneno crotálico é produzida pela crotoxina, um dos principais componentes do veneno e que representa quase 50 % do peso seco. A crotoxina é uma proteína neurotóxica pré-sináptica que atua nas terminações nervosas motoras (bloqueio neuromuscular), causando paralisia motora e respiratória (fascies miastênica) e esses efeitos são vistos no envenenamento crotálico. A PLA<sub>2</sub> (BtTX-II) purificada do veneno de *Bothriopsis taeniata* apresenta uma leve atividade neurotóxica pré-sináptica, mas a presença dela no veneno é pequena em relação a todas as outras proteínas que ele contém, como informado no processo de

purificação (Tabela 1). Talvez por isso não sejam vistos no envenenamento botrópico os mesmos sintomas presentes no envenenamento crotálico.

BtTX-II PLA<sub>2</sub>D49 foi examinada na sua atividade miotóxica *in vitro* usando as preparações *Biventer cervicis* de pintainho. Não foi observado um incremento na linha base da tensão, que seria um indicativo de atividade miotóxica (Harvey et al., 1994), além disso, estudos de microscopia de luz indicaram que os tecidos tratados com esta toxina apresentaram morfologia pouco distinta ao tecido controle (Figura 24A-24F). Assim, estes estudos morfológicos quantitativos com BtTX-II mostraram ter ligeira ou leve atividade miotóxica *in vitro*.

Estudos preliminares de Porto e colaboradores (2007) mostraram que o envenenamento por esta espécie apresenta atividade miotóxica, sendo esta atividade devido à ação direta das fosfolipases A<sub>2</sub> (Gutierrez e Lomonte, 1995) que afetam a integridade da membrana plasmática das células musculares e/ou indireta, pela isquemia ocasionada por alterações de vasos da microcirculação e artérias intramusculares (Butron et al., 1993). Cabe ressaltar que a miotoxicidade é um efeito local relevante nos venenos de serpentes botrópicas. Em altas concentrações, a enzima BtTX-II causou mudanças morfológicas significativas no músculo esquelético de *Biventer cervicis* (Figura 25), assim sugerindo que, em concentrações superiores, esta toxina provoca atividade miotóxica *in vitro*.

O dano das fibras musculares do músculo *Biventer cervicis* de pintainho nas concentrações baixas não foi intenso como observado na análise morfológica *in vivo* no músculo gastrocnêmio de camundongo. Neste último se observaram maiores mudanças morfológicas e necrose, o que está diretamente relacionado com a liberação de CK. Pode-se afirmar que a referida liberação de CK e os dados resultantes da análise morfológica *in vivo* mostraram uma correlação positiva entre si. O tecido muscular é constituído de vários tipos de fibras e alguns músculos contêm predominantemente fibras oxidativas-lenta de tipo I e de tipo IIA. Outros músculos contêm principalmente fibras glicolíticas rápida do tipo II ou a combinação de fibras oxidativas-lento glicolíticas-rápida (Gutiérrez e Ownby, 2003). Estes tipos de células musculares diferem tanto quanto à estrutura e função quanto a sua bioquímica, e estas variações podem lhes conferir suscetibilidade diferente para a ação de PLA<sub>2</sub>s miotóxicas.

Segundo o proposto por Gutiérrez e Ownby (2003), as PLA<sub>2</sub> são os componentes miotóxicos mais importantes nos venenos de serpentes, induzindo eventos de degeneração muscular. As PLA<sub>2</sub>s miotóxicas ligam-se aos aceptores da membrana plasmática, os quais poderiam se tratar de lípidos ou proteínas, podendo diferir de sua afinidade pelas PLA<sub>2</sub>s. Ao

ligar-se às PLA<sub>2</sub>s miotóxicas, estas produzem uma destruição da membrana através de mecanismos catalíticos ou mecanismos independentes de atividade PLA<sub>2</sub>, no entanto, provocam uma entrada de Ca<sup>2+</sup> bastante pronunciada e que, por sua vez, produzem uma série de eventos degenerativos associados com uma hipercontração, ativação de calpinas e PLA<sub>2</sub> citosólicas e mitocondriais Ca<sup>2+</sup>- dependentes.

Esta proteína BtTX-II apresenta atividade miotóxica levando à instabilidade do sarcolema e danos causados pelo movimento de contração. Após o dano ao sarcolema, um aumento no influxo de cálcio acontece (Alderton e Steinhardt, 2000), o que, por sua vez, pode tornar as fibras musculares mais suscetíveis à necrose (Cohn e Campbell, 2000). Com a necrose, ocorre o rompimento da fibra muscular e extravasamento do conteúdo citoplasmático, o que leva ao grande aumento de algumas proteínas sarcoplasmáticas, como a creatina quinase (Figura 18). A dosagem desta proteína creatina quinase (CK) é como um indicador sensível e específico da lesão muscular em animais domésticos (Kaneko et al., 1997).

A miotoxicidade *in vivo* é difícil de definir na ausência de um estudo formal de patologia do músculo. Segundo nossos resultados, BtTX-II apresenta atividade miotóxica moderada, a qual é confirmada pelas alterações morfológicas nos músculos gastrocnêmio de camundongos *in vivo* (Figura 19), o que nos indica que a atividade fosfolipásica parece ser importante na miotoxicidade, mas não suficiente para o efeito lesivo sobre as células musculares, como tem sido mostrado por PLA<sub>2</sub> cataliticamente inativas. É possível que essas PLA<sub>2</sub>s contenham uma região da molécula, distinta do sítio catalítico, que seja importante para sua atividade fisiopatológica (Lomonte et al., 2003, Montecuccio et al., 2008, Cintra-Francischinelli et al., 2010).

Além disso, BtTX-II não apresentou toxicidade sistêmica, o que é característico de envenenamentos por serpentes do mar, vários elapídeos terrestres e algumas espécies de viperídeos, como a subespécie *cascavel* sul-americana (*Crotalus durissus*) (White, 1995; Warrell, 1996; Gutiérrez e Ownby, 2003). Miotoxinas PLA<sub>2</sub> neurotóxicas também podem estar presentes em várias espécies de Viperídeos/Crotalídeos, como exemplificado por crotoxina, um componente de veneno completamente estudado de *Crotalus durissus terrificus* da América do Sul (Salvini et al., 2001). Por outro lado, as miotoxinas PLA<sub>2</sub> não-neurotóxicas geralmente são achadas nos venenos de Viperídeos, onde são notáveis como componentes abundantes (Andrião-Escarso et al., 2000; Soares et al., 2000a,b).

Uma característica do envenenamento botrópico é o rápido desenvolvimento de edema e inflamação no local de picada caracterizada por infiltração de leucócitos e extravasamento de proteínas plasmáticas, os quais são efeitos decorrentes da ação de mediadores como aminas derivadas de mastócitos, mediadores derivados da ação das ciclooxigenases, bradicina e mediadores quimiotáticos dentre outros (Chaves et al., 1995; Farsky et al., 1997). O edema induzido pelas peçonhas de serpente é bioquimicamente heterogêneo e pode agravar ainda mais o dano tecidual local. Em maior magnitude, o edema pode acentuar o efeito hipovolêmico e hipotensivo da peçonha e culminar em choque cardiovascular (Lomonte et al., 1993). Já uma PLA<sub>2</sub> D49, BthTX-II, de *Bothrops jararacussu*, induziu edema de pata e de pele em ratos, bem como a liberação “*in vitro*” de serotonina a partir de mastócitos peritoneais (Landucci et al., 2000).

Estudos utilizando diferentes venenos ofídicos demonstraram que o início do edema e o tempo necessário para que estes alcancem índices máximos variaram consideravelmente (Selistre de Araujo et al., 1996). Este fato poderia ser explicado por variações na composição e origem dos venenos, bem como por diferenças nas espécies de animais estudados.

A BtTX-II também causou edema de pata em camundongos no tempo em curso após tratamento com diferentes concentrações. Tal efeito inflamatório da BtTX-II pode ser devido, pelo menos em parte, por hidrolisarem fosfolípidos de membrana, liberam o ácido araquidônico, o substrato de ciclooxigenases (COX), originando as prostaglandinas, importantes segundos mensageiros fisiológicos e inflamatórios (Hata e Breyer, 2004). Estes dados estão em concordância com estudos informados para outros venenos botrópicos tanto em ratos quanto em camundongos, que apresentaram um começo bastante rápido (geralmente antes das 3h no pico máximo) seguido por um declínio gradual durante as 24h seguintes (Lobo de Araújo et al., 2000; Chacur et al., 2001; Faria et al., 2001; Carneiro et al., 2002; Kanashiro et al., 2002; Calgarotto et al., 2008).

Os resultados de citotoxicidade da PLA<sub>2</sub> BtTX-II em mioblastos e miotubos quando avaliados pelo método de cristal violeta confirmam o proposto por Angulo e Lomonte (2005) e Lomonte et al. (1999), que mostraram que o efeito citolítico de PLA<sub>2</sub>s miotóxicas do grupo II testadas, em todos os casos, foram significativamente mais alto em miotubos (células musculares mais diferenciadas) que em mioblastos. Nossos resultados concordam com a literatura ao observar uma diminuição da viabilidade nesta linhagem de células, miotubos em cultura celular, mostrando uma alta suscetibilidade e que está ausente para com mioblastos C2C12 (Figura 27 e

28). Tentando especular a possível razão pela mais alta suscetibilidade de miotubos diferenciados, em comparação a outros tipos celulares testados em outros estudos prévios (Lomonte et al., 1994; Incerpi et al., 1995), tais como, estudos feitos para compreender a ligação da crotoxina mostraram que esta PLA<sub>2</sub> (componente B) pode interagir com receptores de proteína de membrana ou lipídios de membrana com notórias afinidades diferentes, sendo o anterior muito mais alto (Bon, 1997). Si esto é certo no caso de outras PLA<sub>2</sub>s, então, nas concentrações relativamente altas requeridas para lisar rapidamente diferentes células em cultura (concentração micromolar), as PLA<sub>2</sub>s classe II poderia estar agindo pelo reconhecimento de lipídios de membrana relativamente onipresentes (sítios aceptores de baixa afinidade), explicando a especificidade celular amplamente observada na ação citolítica (Lomonte et al., 1994). Por outro lado, fusão e diferenciação de mioblastos em miotubos podem induzir a expressão de sítio de receptor ou aceptor de alta afinidade para PLA<sub>2</sub>s miotóxicas, aumentando a suscetibilidade para concentrações de miotoxina inferiores. Um receptor PLA<sub>2</sub> de membrana, nomeado receptor tipo M, foi caracterizado em células de músculo esquelético (Lambeau et al., 1997), embora seu possível papel funcional na ação de PLA<sub>2</sub>s miotóxicas classe II não esta claramente definido. Como uma visão alternativa, devido às suas características estruturais e fisiológicas particulares, miotubos podem ter uma menor capacidade para lidar com perturbações da homeostase membrana em comparação com outros tipos celulares, como sugerido por Lomonte et al. (1994), sendo assim mais suscetível à ação de miotoxinas. Ambas as hipóteses seria compatível com o observado, seletividade das PLA<sub>2</sub>s miotóxicas para fibras musculares esqueléticas maduras *in vivo*.

A linhagem de mioblastos C2C12 derivados de músculo esquelético de camundongos exhibe a maioria das características dos mioblastos normais e se diferenciam em cultura, propiciando um bom modelo para estudar a proliferação e a diferenciação de células musculares. Assim, como em outras PLA<sub>2</sub>s a BtTX-II também induz mionecrose local severa, quando injetada por via intramuscular, mas são destituídas de atividade miotóxica sistêmica (Gutiérrez e Lomonte, 1995). A ausência de miotoxicidade sistêmica da PLA<sub>2</sub> BtTX-II pode estar relacionada a ligação não-específica dessa proteína com os diversos tipos celulares (Bultrón et al., 1993; Lomonte et al., 1999), impedindo a orientação desta para sítios farmacológicos distantes, como células musculares. De fato, quando testada *in vitro* (cultura de mioblastos/miotubos), esta proteína BtTX-II é colocada diretamente em contato com os possíveis alvos de ação ou sítios de aceptores (glicerofosfolipídios ou glicolipídios) que poderiam ser expressos diferencialmente ou

diferencialmente aglomerados em miotubos, abundantes nas fibras musculares adultas, não se perdendo por ligações a sítios não-específicos (Angulo e Lomonte, 2005). Várias observações sugerem que os fosfolípidios carregados negativamente (Díaz et al., 2001) podem ser os aceptores importantes para o mecanismo miotóxico destas proteínas (Gutiérrez e Ownby, 2003).

Os mioblastos são precursores das células satélites, obtidos através de biópsia do músculo esquelético, seguido de cultura “*in vitro*”. Estas são células de pequenas dimensões, mononucleares, localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema na periferia da fibra muscular esquelética madura. Elas permanecem em estado quiescente e, em caso de lesão muscular, são rapidamente mobilizadas, proliferam e se fundem com as células lesadas a fim de atuar no reparo do tecido muscular. A atividade catalítica sobre membranas sugere um importante papel das fosfolipases A<sub>2</sub> de venenos de serpentes na sua toxicidade. Este fato pode ser explicado, pelo desarranjo dos componentes fosfolipídicos que ocasiona severas alterações na integridade estrutural e funcional das membranas plasmáticas com consequente influxo de íons cálcio (Montecucco et al., 2008) acarretando a liberação de proteases dependentes de cálcio (Gutiérrez e Ownby, 2003), a ativação de PLA<sub>2</sub> endógenas (Trump et al., 1981) e o colapso mitocondrial (Gopalakrishnakone et al., 1984). A somatória de todas essas alterações moleculares poderia resultar em morte celular.

O veneno de *Bothriopsis taeniata* foi caracterizado por apresentar atividade hemorrágica, anticoagulante e miotóxica (Porto et al., 2007). Este veneno contém miotoxinas que têm estrutura fosfolipase A<sub>2</sub> que afetam as fibras musculares, rompendo a integridade da membrana plasmática. O presente estudo demonstrou que BtTX-II é uma PLA<sub>2</sub> que induz mionecrose após injeções intramusculares em camundongos em diferentes concentrações. Os resultados foram corroborados com as alterações de tecido locais induzidas por venenos de serpentes botrópicas que estão associados às reações inflamatórias conspícuas, caracterizadas por edema (Chaves et al., 1995), dor (Chacur et al., 2001) e infiltração de leucócito (Farsky et al., 1997).

As células satélites fazem parte de uma população de células com grande atividade mitogênica que contribuem para o crescimento muscular pós-natal, o reparo de fibras musculares danificadas e a manutenção do músculo esquelético adulto. São células indiferenciadas e mononucleadas, cuja membrana basal está em continuidade com a membrana basal da fibra muscular (Harris et al., 2003). A patogênese de dano de tecido muscular local induzido por venenos de serpentes *Bothrops* tem sido parcialmente investigada experimentalmente (Gutiérrez e Lomonte, 1989; Ownby, 1982; Gutiérrez et al., 2009). No caso de venenos de espécies

*Bothrops*, estas alterações envolvem a ação de fosfolipases A<sub>2</sub> miotóxicas (Gutiérrez e Lomonte, 1997) e metaloproteinases hemorrágicas (Gutiérrez e Rucavado, 2000). Assim, muitas fosfolipases A<sub>2</sub> já descritas são capazes de induzir mionecrose.

Após uma lesão o músculo tem a habilidade de iniciar um processo de reparo altamente organizado de forma a prevenir a perda de massa muscular (Chargè e Rudnicki, 2004; Shi e Garry, 2006). O remodelamento muscular envolve a reação inflamatória, necrose das células danificadas, fagocitose de restos necróticos, proliferação de células satélites, e a recuperação gradual das propriedades funcionais do músculo. Nossos resultados em regeneração muscular induzida por BtTX-II, evidenciaram, nos diferentes tempos de análise, a presença constante de células polimorfonucleares (Figura 29). A função destas células do sistema imune não está muito esclarecida. Alguns estudos descrevem que os neutrófilos estão envolvidos em danificar miotubos em cultura (Pizza et al., 2001). Uma vez que os polimorfonucleares migram ao local inflamatório, eles podem promover o recrutamento e ativação de monócitos/macrofagócitos e linfócitos, atuando como reguladores dos tipos de leucócitos que farão a infiltração nas células musculares durante o curso da inflamação. Polimorfonucleares também podem contribuir para resolver alterações de tecido causadas por vários agentes prejudiciais, como venenos. Estas contribuições podem ser pela remoção de restos celulares necróticos, conduzindo ordenadamente na substituição celular, conserto de tecido e regeneração muscular (Tidball, 1995). Pelo que foi sugerido, os neutrófilos podem contribuir na patologia local de envenenamento produzindo várias espécies reativas, como superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e peroxinitritos (Zamunér et al., 2001).

A regeneração muscular é, portanto, um processo complexo que requer uma modulação coordenada entre as células-satélite, fatores de crescimento, citocinas, respostas inflamatórias, componentes vasculares e da matriz extracelular (Goetsch et al., 2003; Hawke et al., 2003).

## VI. Conclusão

- 6.1. Utilizando metodologias otimizadas de purificação através de dois passos cromatográficos (exclusão molecular e HPLC de fase reversa), foi possível purificar uma nova miotoxina PLA<sub>2</sub> D49 a partir do veneno total de *Bothriopsis taeniata*, denominada BtTX-II, com um alto grau de pureza, homogeneidade molecular e sem perda da atividade biológica.
- 6.2. BtTX-II possui uma massa molecular de 13889.98 Da, de caráter básico, revelado na análise de composição de aminoácidos e presença de 14 resíduos de Cys. Peptídeos trípticos determinados por espectrometria de massa *in tandem*, apresentam alta homologia com outras PLA<sub>2</sub> de veneno de serpente.
- 6.3. BtTX-II apresentou atividade enzimática ótima entre 35° e 45 °C e pH 8,0. Na presença do substrato 4N3OBA, esta PLA<sub>2</sub> mostra comportamento alostérico especialmente com baixas concentrações do substrato. BtTX-II mostra também ser uma PLA<sub>2</sub> Ca<sup>2+</sup> dependente, e sua atividade é menor na presença de outros cátions.
- 6.4. A miotoxina PLA<sub>2</sub> D49 BtTX-II foi capaz de induzir miotoxicidade local “*in vivo*”, incrementando os níveis de CK plasmático, porém não mostrou miotoxicidade sistêmica.
- 6.5. A miotoxina PLA<sub>2</sub> BtTX-II apresenta atividade edematogênica e citotóxica em miotubos C2C12.
- 6.6. A miotoxina BtTX-II foi capaz de induzir bloqueio neuromuscular parcial da resposta contrátil na junção neuromuscular em preparações *biventer cervicis* de pintainho, desde que em altas concentrações.
- 6.7. BtTX-II induz regeneração muscular quando o tecido é tratado com baixas concentrações (10 µg) durante o período de 28 dias após injeções intramusculares.
- 6.8. BtTX-II, ao exibir uma gama diversa de eventos farmacológicos, apresenta um enigma em sua relação estrutura-função, no sentido de determinar que mecanismos encontram-se envolvidos em determinados efeitos biológicos analisados. É necessário ter maiores esforços na área bioquímica, biologia molecular, fisiologia, histologia e farmacologia já que todas estas poderiam contribuir para uma melhor compreensão de seu mecanismo da ação.

## VII. Referências Bibliográficas

- Alderton, J.M., Steinhardt, R.A. 2000. How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends Cardiovasc Med.* 10(6): 268-272.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3): 403-410.
- Andrião-Escarso, S.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Angulo, Y., Díaz, C., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R. 2000. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie* 82: 755–763.
- Angulo, Y., Lomonte, B. 2005. Differential susceptibility of C2C12 myoblasts and myotubes to group II phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms. *Cell Biochemistry and Function.* 23: 307-313.
- Arce, V., Brenes, F., Gutiérrez, J.M. 1991. Degenerative and regenerative changes in murine skeletal muscle after injection of venom from the snake *Bothrops asper*: a histochemical and immunocytochemical study. *Int. J. Exp. Path.* 72: 211-226.
- Arcolini, T. Guia de animais brasileiros: Répteis e Peixes de água doce. Editora: On-Line, ano I, n.2, pp 22- 30, São Paulo, 2006.
- Arita, H., Nakano, T., Hanasaki, K. 1989. Thromboxane A<sub>2</sub>: its generation and role in platelet activation. *Prog. Lipid Res.* 28: 273-301.
- Arni, R.K.; Ward, R.J. 1996. Phospholipase A<sub>2</sub>-a structural review. *Toxicon.* 34(8): 827-841.
- Arroyo, O., Rojas, G., Gutiérrez, J.M. 1999. Envenenamiento por Mordedura de Serpiente en Costa Rica en 1996: Epidemiología y Consideraciones Clínicas. *Acta médica costarricense.* 41: 22-26.
- Asakura, A. 2003. Sperm cell in adult skeletal Muscle. *Trends Cardiovasc Med.* 13(3): 123-128.
- Azevedo, L.H., Eduardo, F.P., Moreira, M.S., Eduardo, C.P., Marques, M.M. 2006. Influence of Different Power Densities of LILT on Cultured Human Fibroblasts Growth. A pilot study. *Lasers Med Sci.* 21(2): 86–89.
- Azevedo-Marques, M.M., Cupo, P., Coimbra, T.M., Hering, S.E., Rossi, M.A., Laure, C.J. 1985. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon.* 23: 631-636.
- Bao, Y., Bu, P., Jin, L., Hongxia, W., Yang, Q., An, L. 2005. Purification, characterization and gene cloning of a novel phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(3): 558-565.

- Barraviera, B., Pereira, P.C.M. 1994. Acidentes por serpentes do gênero “Bothrops”, p.261-280. In: Barraviera B. (ed.) Venenos Animais, uma Visão Integrada. EPUC, Rio de Janeiro.
- Beghini, D.G., Cruz-Höfling M.A., Randazzo-Moura, P., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J.C., Hyslop, S., Marangoni, S. 2005. Cross-neutralization of the neurotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms by antisera against crotoxin and phospholipase A<sub>2</sub> from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon*. 46: 604-611.
- Beghini, D.G.; Toyama, M.H.; Hyslop, S.; Sodek, L.C.; Novello, J.C.; Marangoni, S. 2000. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A<sub>2</sub> from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (maracambóia) venom, *J. Protein. Chem.* 19: 679– 684.
- Berg, O.G.; Gelb, M.H.; Tsai, M.; Jain, J.K. 2001. Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A<sub>2</sub>-paradigm. *Chemical Reviews*, 101: 2613-2653.
- Bochner, R., Struchiner, C.J. 2002. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil. Uma revisão. *Cad. Saúde pública*, Rio de Janeiro, v.18, n.3, pp. 735-746.
- Bon, C. 1997. Multicomponent neurotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. In *Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: structure, function, and mechanism*. Ed. R. M. Kini, John Wiley and Sons, England. pp. 267±285.
- Bonfim, V.L., Ponce-Soto, L.A., Martins-de-Souza, D., Souza, G.H.M.F., Baldasso, P., Eberlin, M.N., Marangoni, S. 2008. Structural and functional characterization of myotoxin, Cr-IV 1, a phospholipase A<sub>2</sub> D49 from the venom of the snake *Calloselasma rhodostoma*. *Biologicals* 36: 168-176.
- Bonfim, V.L., Ponce-Soto, L.A., Novello, J.C., Marangoni, S. 2006. Cytotoxic action in myoblasts and myotubes (C2C12) and enzymatic characterization of a new phospholipase A<sub>2</sub> isoform (Bj-V) from *Bothrops jararacussu* venom. *Protein Pept Lett.* 13(7):707-13.
- Bonfim, V.L., Toyama, M.H., Novello, J.C., Hyslop, S., Oliveira, C.R.B., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S. 2001. Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom. *J. Protein Chem.* 20: 239–245.
- Borges, R.C. 1999. Serpentes Peçonhentas Brasileiras. Manual de Identificação, Prevenção e Procedimentos em Caso de Acidentes. Atheneu, São Paulo.
- Bradford, M.M.A. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye-Bonding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Breithaupt, H. 1976. Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A<sub>2</sub> and the crotoxin complex. *Toxicon*. 14: 221-233.
- Burke, J.E., Dennis, E.A. 2009. Phospholipase A<sub>2</sub> Biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther.* 23: 49–59.
- Butantan. 2001. Prevenção de Acidentes com Animais Peçonhentos. Instituto Butantan Fundacentro.1.ed. São Paulo, pp.4-46.

- Butron, E., Ghelestam, M., Gutierrez, J.M. 1993. Effects on cultured mammalian cells of mutotoxin III, a phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) venom. *Biochim Biophys Acta*, 1179: 253-259.
- Bultrón, E., Gutiérrez, J.M.; Thelestam, M. 1993. Effects of *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin III, a basic phospholipase A<sub>2</sub>, on liposomes and mouse gastrocnemius muscle. *Toxicon*. 31: 217-222.
- Calgarotto, A.K., Damico, D.C., Ponce-Soto, L.A., Baldasso, P.A., Da Silva, S.L., Souza, G.H., Eberlin, M.N., Marangoni, S. 2008. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A<sub>2</sub> BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*. 51(8): 1509–1519.
- Campbell, J.A., Lamar, W.W. 2004. The venomous reptiles of the Latin America. Comstock. Publishing Associates, Ithaca.
- Carneiro, A.S.; Ribeiro, O.G.; de Franco, M., Cabrera, W.H.K.; Vorraro, F.; Siquiera, M.; Ibáñez, O.M.; Starobinas, N. 2002. Local inflammatory reactions induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon*. 40: 1571-1579.
- Cavalcante, W.L., Silva, M.D., Gallacci, M. 2005. Influence of temperature upon paralyzing and myotoxic effects of bothropstoxin-I on mouse neuromuscular preparations. *Chem. Biol. Interact*. 151: 95-100.
- Chacur, M., Picolo, G., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F.P., Cury, Y. 2001. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*. 39: 1173–1181.
- Chang, C.C., Lee, J.D. 1977. Crotoxin, The Neurotoxin of South American Rattlesnake Venom, is a Presynaptic Toxin Acting Like  $\beta$ -Bungarotoxin. *Naunyn-Schmiedeberg. Arch.Pharmacol*. 296: 159-168.
- Charge, S.B.P., Rudnicki, M.A. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev*. 84: 209-238.
- Chaves, F., Alvarado, J., Aymerich, R., Solórzano, A. 1996. Aspectos básicos sobre las serpientes de Costa Rica. 3 ed. San José, C.R. Oficina de publicaciones de la Universidad de Costa Rica. pp. 61.
- Chaves, F., Barboza, M., Gutiérrez, J.M. 1995. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*. 33: 31–39.
- Chippaux, J.P. 1998. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull WHO* 76: 515-524.
- Chippaux, J.P., Goyffon, M. 1998. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*. 36 (6): 823-846.
- Cho, W., Kezdy, F.J. 1991. Chromogenic substrates and assay of phospholipases A<sub>2</sub>, *Methods Enzymol*. 197: 75– 79.

- Cintra-Francischinelli, M., Pizzo, P., Angulo, Y., Gutierrez, J. M., Montecucco, C. Lomonte, B. 2010. The C-terminal region of a Lys49 myotoxin mediates Ca<sup>2+</sup> influx in C2C12 myotubes. *Toxicon*, 55: 590–596.
- Cisne de Paula, R., Castro, H.C., Rodrigues, C.R., Melo, P.A., Fuly, A.L. 2009. Structural and Pharmacological Features of Phospholipases A<sub>2</sub> from Snake Venoms. *Protein & Peptide Letters*. 16: 899-907.
- Clemente, C.F., Corat, M.A., Saad, S.T., Franchini, K.G. 2005. Differentiation of C2C12 myoblasts is critically regulated by FAK signaling. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289(3): 862-70.
- Cohn, R. e Campbell, K.P. 2000. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 23(10): 1456-1471.
- Costa, P.D., Toyama, M.H., Marangoni, S., Rodrigues-Simioni, L., Cruz-Höfling, M.A. 1999. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor *digitorum longus* (EDL) muscle preparation. *Toxicon official journal of the International Society on Toxinology*. 37(8): 1143-1153.
- Cunha, O.R., Nascimento, F.P., Ofídios da Amazônia. X – As cobras da região leste do Pará. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 1978.
- Damico, D.C., Lilla, S., de Nucci, G., Ponce-Soto, L.A., Winck, F.V., Novello, J.C., Marangoni, S. 2005. Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp49 phospholipase A<sub>2</sub> isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1726: 75–86.
- Davidson, F.F., Dennis, E.A. 1990. Amino acid sequence and circular dichroism of Indian cobra (*N. naja naja*) venom acidic phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochim. Biophys. Acta*. 1037: 7-15.
- de Araujo, H.S.S., White, S.P., Ownby, C.L. 1996. Sequence analysis of Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins: A highly conserved class of proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 326: 21–30.
- de Carvalho, C.M., de Souza Alencar, I.C., Vilar, J.C. 2007. Serpentes da região de Manaus, Amazônia Central, Brasil. *Biol. Geral Exper., São Cristóvão, SE* 7(2): 41-59.
- Dennis, E.A. 1994. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 269: 13057-13060.
- Díaz, C., León, G., Rucavado, A., Rojas, N., Schroit, A.J., Gutiérrez, J.M. 2001. Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>; role negatively charged phospholipids as potential membrane binding sites. *Arch Biochem Biophys.* 391: 56-64.
- Fanò, G., Di Tano, G., Parabita, M., Beltramin, A., Mariggiò, M.A. 2004. Stem Cells in Adult Skeletal Muscle Tissue: More than a Working Hypothesis. *Basic Appl Myol.* 14(1): 13-15.

- Faria, L., de Antunes, E., Bon, C., Lôbo de Araújo, A. 2001. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. *Toxicon*. 39: 825-830.
- Farsky, S.H.P., Costa-Cruz, J.W.M., Cury, Y., Teixeira, C.F.P. 1997. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom. In vivo and in vitro studies. *Toxicon*. 35: 185–193.
- Fenwick, A.M., Gutberlet Jr., R.L., Evans, J.A., Parkinson, C.L. 2009. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zool. J. Linn. Soc.* 156(3): 617-640.
- França, F.O.S., Málaque, C.M.S. 2003. Acidente botrópico. In: Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes (Cardoso J.L.C., F.O.S França, F.H. Wen, C.M.S. Málaque & V. Haddad Jr. Eds.) Sarvier-Fapesp, São Paulo. pp. 72 - 86.
- Francis, B., Gutierrez, J.M., Lomonte, B., Kaiser, I.I. 1991. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom in a lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub>. *Arch. Biochem. Biophys.* 284: 352-359.
- Fry, M.R., Ghosh, S.S., East, J.M., Franson, R.C. 1992. Role of human sperm phospholipase A<sub>2</sub> in fertilization: effects of a novel inhibitor of phospholipase A<sub>2</sub> activity on membrane perturbations and oocyte penetration. *Biol. Reprod.* 47: 751–759.
- Fuly, A.L., Miranda, A.P., Zingali, R.B., Guimares, J.A. 2002. Purification and characterization of a phospholipase A<sub>2</sub> isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. *Biochem. Pharmacol.* 63: 1589-1597.
- FUNASA, Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Ministério da Saúde. FUNASA. 2 ed. Brasília. pp.120, 2001.
- Ginsborg, B.L., Warriner, J. 1960. Isolated chick *biventer cervicis*-nerve muscle preparation. *Br. J. Pharmacol.* 15: 410-11.
- Goetsch, S.C., Hawke, T.J., Gallardo, T.D., Richardson, J.A., Garry, D.J. 2003. Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiol Genomics*. 14: 261–271.
- Golay, P., Smith, H. M., Broadley, D. G., Dixon, J. R., McCarthy, C., Rage, J.-C., SchaËtti, B., Toriba, M. 1993. Endoglyphs and Other Major Venomous Snakes of the World. A Checklist. Azemiops, Geneva.
- Gopalakrishnakone, P., Dempster, D.W., Hawgood, B.J., Elder, H.Y. 1984. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> complex. *Toxicon*. 22: 85-98.
- Grazziotin, F., Echeverrigaray, S. 2005. Genetic relationships among species of the genus *bothrops* based on RAPD markers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48 (3): 359-365.

- Greene, H.W., 1992. The ecological and behavioral context of pitviper evolution. In: Campbell, J.A., Brodie, E.D., Jr. (Eds.), *Biology of the Pitvipers*. Selva, Tyler, TX, pp. 107–118.
- Gutiérrez, J.M., Arce, V., Brenes, F., Chaves, F. 1990. Changes in myofibrillar components after skeletal muscle necrosis induced by a myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Exp. Mol. Path.* 52: 25-36.
- Gutiérrez, J.M., Cerdas, L. 1984. Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. *Revista de Biología Tropical*. 32: 213-222.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. 1989. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. *Memorias Instituto Butantan*. 51: 211–223.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. 1995. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. 33: 1405-1424.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. 1997. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: *Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: structure, function, and mechanism*. England, UK: John Wiley & Sons, pp. 321-352.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. 2003. Cap. 32. Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en America Latina - Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes Ed. Sarvier, São Paulo pp 310-323.
- Gutiérrez, J.M., Núñez, J., Díaz, C., Cintra, A.C.O., Homsí-Brandeburgo, M.I., Giglio, J.R. 1991. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp. Mol. Pathol.* 55: 217-229.
- Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L. 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanism of local and systematic myotoxicity. *Toxicon*. 42: 915-931.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A. 2000. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82: 841-850.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Chaves, F., Díaz, C., Escalante, T. 2009. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*. 54: 958-975.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Diaz, C. 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45: 997-1011.
- Gutiérrez, J.M., Sanz, L., Escolano, J., Fernandez, J., Lomonte, B., Ângulo, Y., Rucavado, A., Warrell, D.A., Calvete, J.J. 2008. Snake venomomics of the Lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. *J Proteome Res*. 7: 4396-4408.
- Harris, J.B. 1991. Phospholipases in snake venoms and their effect on the nerve and muscle, In: *Snake Toxins*, Harvey A.L. (ed), pp 91 – 129.

- Harris, J.B. 2003. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> and the regeneration of skeletal muscles. *Toxicon* 42: 933-945.
- Harris, J.B., Cullen, M.J. 1990. Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. *Electron Microsc. Rev.* 3: 183-211.
- Harris, J.B., Vater, R., Wilson, M., Cullen, M.J. 2003. Muscle fibre breakdown in venom induced muscle degeneration. *J. Anat.* 202: 363-372.
- Harvey, A.L., Barfaraz, A., Thomson, E., Faiz, A., Preston, S., Harris, J.B. 1994. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. *Toxicon* 32: 257-265.
- Hass, A., Rossberg, M.I., Hodes, H.L., Yatt, A.C., Hodes, D.S. 1986. Endotoxin levels in immunocompromised children with fever. *J Pediatr*, 109: 265-269.
- Hawke, T.J., Meeson, A., Jiang, N., Graham, S., Hutcheson, K., DiMaio, M., Garry, D.J. 2003. p21 is essential for normal myogenic progenitor cell function in regenerating skeletal muscle. *Am J Physiol*, 285: C1019-C1027.
- Henrikson, R.L., Krueger, E.T.; Keim, P.S. 1977. Amino acid sequence of phospholipase A<sub>2</sub>- $\alpha$  from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipases A<sub>2</sub> based upon structural determinants. *J. Biol. Chem.* 252: 4913-4921.
- Henrikson, R.L., Meredith, S.C. 1984. Amino acid analysis by reverse phase high performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*. 136: 65-71.
- Hodgson, W.C., Wickramaratna J. 2002. In vitro neuromuscular activity of snake venoms *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 29: 807-814.
- Holzer, M., Mackessy, S.P. 1996. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A<sub>2</sub>, *Toxicon* 34: 1149- 1155.
- Incerpi, S., de Vito, P., Luly, P., Rufini, S., 1995. Effect of ammodytin L from *Vipera ammodytes* on L-6 cells from rat skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 1268: 137-142.
- Janssen, M.J.W., van de Wiel, W.A.E.C., Beiboer, S.H.W., van Kampen, M.D., Verheij, H.M., Slotboom, A.J., Egmond, M.R. 1999. Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> probed by the variants H48Q, H48N and H48K. *Protein Engineering*, 12(6): 497-503.
- Kamata, K., Nishimura, M., Eiki, J., Nagata, Y. 2004. Structural Basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure* 12: 429-438.
- Kanashiro, M.M., de Cássia, M., Escocard, R., Petretski, J.H., Prates, M.V., Alves, E.W., Machado, O.L.T., da Silva, W.D., Kipnis, T.L. 2002. Biochemical and biological properties of phospholipases A<sub>(2)</sub> from *Bothrops atrox* snake venom . *Biochem Pharmacol.* 64: 1179-1186.

- Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. Clinical biochemistry of domestic animals. Califórnia: Academic Press. 1997. pp. 932.
- Kang, T.S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M.T., Sinha, M., Kumar, R.P., Kaur, P., Kumar, S., Dey, S., Sharma, S., Vrieling, A., Betzel, C., Takeda, S., Arni, R.K., Singh, T.P., Kini, R.M. 2011. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS Journal* 278: 4544–4576.
- Karlsson, E. Chemistry of protein toxins in snake venoms. In: LEE, C.Y. Handbook of experimental pharmacology. New York: Springer, Berlin Heidelberg, 1979. p. 159-212.
- Kasemkijwattana, C., Menetrey, J., Bosch, P., Somogyi, G., Moreland, M.S., Fu, F.H., Buramapanitkit, B., Watkins, S.S., Huard, J.H. 2000. Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clinical Orthopaedics and Related research*. 370: 272-285.
- Kelly, R.B., von Wedel, R.J., Strong, P.N. 1979. Phospholipase dependent and phospholipase-independent inhibition of transmitter release by b-bungarotoxin. *Adv. Cytopharmacol* 3: 77–85.
- Kini R.M. 1997. Phospholipase A<sub>2</sub>: a complex multifunctional protein puzzle in: R. M. Kini (Ed), *Venom Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester pp. 1-28.
- Kini, R.M. 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Toxicon*. 42: 827–840.
- Kini, R.M. 2004. Platelet aggregation and exogenous factors from animal sources. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 4: 301-25.
- Kini, R.M. 2005. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A<sub>2</sub> enzymes from snake venoms. *Toxicon*. 45: 1147-61.
- Kordis, D., Krizaj, I., Gunensek, F. 2002. Functional diversification of animal toxins by adaptative evolution. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Krizaj, I., Bieber, A.L., Ritonja, A., Gubensek, F. 1991. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Vipera ammodytes* venom. *Eur J Biochem*. 202(3): 1165-1168.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680–685.
- Laloo, D.G, Trevett, A.J, Black, J, Mapao, J, Saweri, A, Naraqi, S, Owens, D, Kamiguti, A.S, Hutton, R.A, Theakston, R.D, Warrell, D.A. 1996. Neurotoxicity, anticoagulant activity and evidence of rhabdomyolysis in patients bitten by death adders (*Acanthophis sp.*) in southern Papua New Guinea. *QJM*. 89(1): 25-35.
- Landucci, E.C., Castro, R.C., Toyama, M.H., Giglio, J.R., Marangoni, S., De Nucci, G., Antunes, E. 2000. Inflammatory edema induced by the lys-49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue

- piratoxin-I in the rat and rabbit. Effect of polyanions and p-bromophenacyl bromide. *Biochem Pharmacol.* 59: 1289–94.
- Lee, W-H., da Silva Giotto, M.T., Marangoni, S., Toyama, M.H., Polikarpov, I., Garratt, R.C. 2001. Structural Basis for Low Catalytic Activity in Lys49 Phospholipases A<sub>2</sub>—A Hypothesis: The Crystal Structure of Piratoxin II Complexed to Fatty Acid. *Biochemistry.* 40 (1): 28–36.
- Lefaucheur, J.P., Sébille, A. 1995. The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. *Neuromusc Disord.* 5(6): 501-509.
- Lewis, R.L., Gutmann, L. 2004. Snake venoms and the neuromuscular junction. *Semin Neurol.* 24: 175–179.
- Lira-da-Silva, R.M., Mise, Y.F., Casais-e-Silva, L.L., Ulloa, J., Hamdan, B., Brazil, T.K. 2009. Snakes of Medical Importance in Northeast of Brazil, *Gaz. méd. Bahia*, 79(1):7-20.
- Liu, S.Y., Yoshizumi, K., Oda, N., Ohno, M., Tokunaga, F., Iwanaga, S., Kihara, H. 1990. Purification and amino acid sequence of basic protein II, a lysine-49-phospholipase A<sub>2</sub> with low activity, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. *J. Biochem.* 107: 400-408.
- Lizano, S., Domont, G., Perales, J. 2003. Natural phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon*, 42(8): 963-977.
- Lôbo de Araújo, A., de Souza, A.O., Cruz-Höfling, M.A., Flores, C.A., Bom, C. 2000. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. *Toxicon.* 38: 209-221.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón, L. 2003. An overview of Lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon.* 42: 885–901.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Rufini, S., Cho, W., Giglio, J.R., Ohno, M., Daniele, J.J., Geoghegan, P., Gutiérrez, J.M. 1999. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> on mouse endothelial (t End) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. *Toxicon.* 37: 145–158.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J.M. 2009. The Phospholipase A<sub>2</sub> Homologues of Snake Venoms: Biological Activities and Their Possible Adaptive Roles. *Protein & Peptide Letters.* 16: 860-876.
- Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, L.A. 1994. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> of *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon.* 32: 1359-1369.
- Lomonte, B.; Tarkowski, A.; Hanson, L.A. 1993. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation.* 17: 93-105.
- Lopes-Martins, R.A.B., Marcos, R.L., Leonardo, P.S., Prianti, Jr.A.C., Muscará, M.N., Aimbire, F., Frigo, L., Iversen, V.V., Bjordal, J.M. 2006. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655

- nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol.* 101: 283–288.
- Mallow, D., Ludwig, D., Nilson, G. 2003. True Vipers. Natural History and Toxinology of Old World Vipers. Krieger Publishing Company, Malabar, Florida.
- Marques, M.M., Cupo, P., Hering, S. E. 2003. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes Peçonhentas. Simpósio: Urg. e Emerg. Dermatol e Toxicológicas, cap IV, Ribeirão Preto, 36: 480-489.
- Marti-Renom, M.A., Stuart, A., Fiser, A., Sanchez, R., Melo, F., Sali, A. 2000. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 291-325.
- McDiarmid, R.W., Campbell, J.A., Touré, T. 1999. Snake Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference, vol. 1. In: The Herpetologists' League, Washington, D.C., USA, pp. xi + 511.
- Mebs, D., Kuch, U., Coronas, F.I.V., Batista, C.V.F., Gumprecht, A., Possani, L.D. 2006. Biochemical and biological activities of the venom of the Chinese pitviper *Zhafermia mangshanensis*, with the complete amino acid sequence and phylogenetic analysis of a novel Arg49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin. *Toxicon.* 47(7): 797-811.
- Mebs, D., Ownby, C.L. 1990. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmac. Ther.* 48: 223-236.
- Melgarejo, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: Cardoso, J. L. C; França, F.O.S; Wen, F.H.; Málaque, C. M. S.; Haddad Jr, V. 2003. Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo: Sarvier, pp. 4-68.
- Menez, A., Stocklin, R., Mebs, D. 2006. 'Venomics' or: The venomous systems genome project. *Toxicon* 47: 255-259.
- Michalany, J. Técnica histológica em anatomia patológica. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária. 1980. 277p.
- Miranda-Silva, R. Impacto por atropelamento em jararaca tigrina (*Bothriopsis taeniata*) (Wagler, 1824) na floresta nacional de Carajás, Pará. Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, 13 a 17 de Setembro de 2009. São Lourenço-MG.
- Montecucco, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci.* 65(18), 2897-2912.
- Monterrey, F. 2001. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias, UCV, Caracas, Venezuela.
- Moura da Silva, A.M., Desmond, H., Laing, G., Theakston, R.D. 1991. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. *Toxicon.* 29: 713- 723.

- Moura-da-Silva, A.M., Paine, M.J., Diniz, M.R., Theakston, R.D., Crampton, J.M. 1995. The molecular cloning of a phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom: evolution of venom group II phospholipase A<sub>2</sub>s may imply gene duplications. *J. Mol. Evol.* 41(2), 174–179.
- Mukheerjee, A.B., Meile, L., Pattabiraman, N. 1994. Phospholipase A<sub>2</sub> enzyme: regulation and physiological role. *Biochem pharmacol.* 5: 1-10.
- Murakami, M.T., Gabdoulkhakov, N., Genov, A., Cintra, A.C.O., Betzel, C., Arni, R.K. 2006. Insights into metal ion binding in phospholipases A<sub>2</sub>: ultra high-resolution crystal structures of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> in the Ca<sup>2+</sup> free and bound states. *Biochimie* 88: 543–549.
- Murakami, M.T., Kuch, U., Betzel, C., Mebs, D., Arni, R.K. 2008. Crystal structure of a novel myotoxic Arg49 phospholipase A<sub>2</sub> homolog (zhaoermiatoxin) from *Zhaoermia mangshanensis* snake venom: insights into Arg49 coordination and the role of Lys122 in the polarization of the C-terminus. *Toxicon.* 51(5): 723-735.
- Nakajima, M., Hanasaki, K., Ueda, M., Arita, H. 1992. Effect of pancreatic type phospholipase A<sub>2</sub> on isolated porcine cerebral arteries via its specific binding sites. *FEBS Lett.* 309: 261–264.
- Narahashi, T., Hass, H.G., e Therrien, E.F. 1967. Saxitoxin and tetrodotoxin: comparison of nervo blocking mechanism. *Science.* 22: 1441-1442.
- Ohno, M., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Ogawa, T., Hattori, S. 2003. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venom. *Toxicon* 42: 841-54.
- Ohno, M., Ogawa, T., Oda-Ueda, N., Chijiwa, T., Hattori, S. 2002. Accelerated and regional evolution of snake venom gland isozymes. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Oshima-Franco, Y., Leite, G.B., Dal Belo, C.A., Hyslop, S., Prado-Franceschi, J., Cintra, A.C.O., Giglio, J.R., Cruz-Höfling, M.A., & Rodrigues-Simioni, L. 2004. The presynaptic pctivity of bothroptoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 95: 175–182.
- Otero, R., Gutiérrez, J., Mesa, M.B., Duque, E., Rodriguez, O., Arango, J.L., Gomez, F., Toro, A., Cano, F., Rodriguez, L.M., Caro, E., Martinez, J., Cornejo, W., Gomez, L.M., Uribe, F.L., Cardenas, S., Nunez, V., Diaz, A. 2002. Complications of *Bothrops*, *Porthidium* and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon.* 40: 1107–1114.
- Ownby, C.L. Pathology of rattlesnake envenomation. In: Tu, A.T. editor. Rattlesnake venoms. Their actions and treatment. New York: Marcel Dekker. 1982. pp 163–209.
- Ownby, C.L., Selistre de Araujo, H.S., White, S.P., Fletcher, J.E. 1999. Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins. *Toxicon.* 37: 411–445.
- Pan, H., Liu, X.L., Ou-Yang, L.L., Yang, G.Z., Zhou, Y.C., Li, Z.P., Wu, X.F. 1998. Diversity of cDNAs encoding phospholipase A<sub>2</sub> from *Agkistrodon halys pallas* venom, and its expression in *E. coli*. *Toxicon.* 36(8): 1155-1163.

- Pereira, A.N., Eduardo, C.P., Matson, E., and Marques, M.M. 2002. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg. Med.* 31(4): 263–267.
- Pinho, F.M.O.; Oliveira, E.S.; Faleiros, F. 2004. Acidente ofídico no estado de Goiás. *Ver. Assoc. med. Bras.*, v. 50, p. 1-10.
- Pirolla, R.A.S., Baldasso, P.A., Marangoni, S., Moran, P.J.S., Rodrigues, J.A.R. 2011. Evaluation of Snake Venom phospholipase A<sub>2</sub>: Hydrolysis of Non-natural esters. *J. Braz. Chem. Soc.* 22: 300-307.
- Pizza, F.X., McLoughlin, T.J., McGregor, S.J., Calomeni, E.P., Gunning, W.T. 2001. Neutrophils injure cultured skeletal myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281: C335–C341.
- Polgár, J., Magnenat, E.M., Peitsch, M.C., Wells, T.N.C., Clemetson, K.J. 1996. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M(r) phospholipases A<sub>2</sub>: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A<sub>2</sub>, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). *Biochem J.* 319(3): 961-968.
- Ponce-Soto, L. A.; Bonfim, V. L.; Rodrigues-Simioni, L.; Novello, J. C.; Marangoni, S. 2006. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA<sub>2</sub> D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using in vitro neuromuscular preparation. *Protein J.* 25: 47-55.
- Ponce-Soto, L.A., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S. 2010. Neurotoxic, myotoxic and cytolytic activities of the newbasic PLA<sub>2</sub> isoforms BmjeTX-I and BmjeTX-II isolated from the *Bothrops marajoensis* (Marajó Lancehead) snake venom. *Protein J.* 29: 103–113.
- Ponce-Soto, L.A., Toyama, M.H., Hyslop, S., Novello, J.C., Marangoni, S. 2002. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA<sub>2</sub> from *Crotalus durissus collileneautus* venom. *J. Protein Chem* 21: 131-136.
- Porto, B.N., Tellib, C.A., Dutra, T.P., Alves, L.S., Bozza, M.T., Fin, C.A., Thiesen, F.V., Renner, M.F. 2007. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon* 50: 270-277.
- Prianti, A.C., Ribeiro, W., Lopes-Martins, R.A., Lira-Da-Silva, R.M., Prado-Franceschi, J., Rodrigues-Simioni, L., da Cruz-Höfling, M.A., Leite, G.B., Hyslop, S., Cogo, J.C. 2003. Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick *biventer cervicis* preparations. *Toxicon.* 41: 595–603.
- Queiroz, L.S., Santo Neto, H., Rodrigues-Simioni, L., Prado-Franceschi, J. 1984. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 22: 339-346.
- Rochat, H., Rochat, C., Miranda, F., Lissitzky, S., Edman, P. 1970. The amino acid sequence of neurotoxin I of *Androctonus australis* Hector. *Eur. J. Biochem* 17, 262.

- Rodriguez-Acosta, A., Monterrey, F., céspedes, G., Finol, H.J. 2003. Alteraciones estructurales y ultraestructurales del encéfalo ocasionado por veneno de la serpiente mapanare (*Bothrops colombiensis*). Rev. Toxicol. 20: 199-203.
- Rodriguez-Acosta., A. 2001. Los venenos y el síndrome de envenenamiento ofídico. Vitae: Academia Biomédica Digital, ISSN 1317-987X, N°. 9, <http://caibo.ucv.ve/vitaenueve/articulos/medicinatropical/archivosPDF>.
- Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Aymerich, R. 2001. El envenenamiento Ofídico en Centroamérica: Fisiopatología y tratamiento. San José, CR. Instituto Clodomiro Picado. pp. 35.
- Romero-Vargas, F.F., Ponce-Soto, L.A., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S. 2010. Biological and biochemical characterization of two new PLA<sub>2</sub> isoforms Cdc-9 and Cdc-10 from *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 151: 66–74.
- Rosenberg, P. 1990. Phospholipases. In: Shier W.T, Mebs D. (Eds), Handbook of Toxinology. Marcel dekker, New York, pp 67-227.
- Salvini, T.F., Amaral, A.C., Miyabara, E.H., Turri, J.A.O., Danella, P.M., Selistre de Araujo, H.S. 2001. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. Toxicol. 39: 1141–1149.
- Santos, M.C. 2003. Serpentes peçonhentas e ofidismo no Amazonas. In: Cardoso JLC, França FOS, Hui FW, Malaque CMS, Haddad Jr V (eds) Animais Peçonhentos no Brasil. Editora Sarvier, São Paulo, pp.115-125.
- Saotome, K., Morita, H., Umeda, M. 1989. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. Toxic in vitro. 3(4): 317-321.
- Schaloske, R.H., Dennis, E. 2006. The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. Biochim. Biophys. Acta. 1761: 1246–1259.
- Schiavo, G., Matteoli, M., Montecucco, C. 2000. Neurotoxins affecting neuroexocytosis, Physiol Rev. 80:717-766.
- Scott, D.L., Sigler, P.B. 1994. Structure and catalytic mechanism of secretory PLA<sub>2</sub>. Adv. Prot. Chem. 43: 53-58.
- Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H., Sigler, P.B. 1990. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>. Science. 250(4987): 1541-1546.
- Selistre de Araujo, H. S., Withe, S. P., Ownby, C. L. 1996. Sequence analysis of Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins. Toxicol 34: 1237-1242.
- Shashidharamurthy, R., Kemparaju, K. 2006. A neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> variant: Isolation and characterization from eastern regional Indian cobra (*Naja naja*). Toxicol. 47: 727-733.

- Shiomi, K., Kazama, A., Shimakura, K., Nagashima, Y. 1998. Purification and properties of phospholipases A<sub>2</sub> from the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) venom. *Toxicon* 36: 589– 599.
- Shi, X., Garry, D.J. 2006. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 20:1692–1708.
- Six, D.A., Dennis, E.A. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1488: 1-19.
- Soares, A.M., Andrião-Escarso, S.H., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Toyama, M.H., Marangoni, S., Arni, R.K., Giglio, J.R. 2000a. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 7–15.
- Soares, A.M., Guerra-Sa´, R., Borja-Oliveira, C., Rodrigues, V.M., Rodrigues-Simioni, L., Rodrigues, V., Fontes, M.R.M., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R. 2000b. Structural and functional characterization of BnSP-7, a lysine-49 myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 378: 201–209.
- Sommers, C.D., Bobbitt, J.L., Bemis, K.G., Snyder, D.W. 1992. Porcine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>-induced contractions of guinea pig lung pleural strips. *Eur. J. Pharmacol.* 216: 87–96.
- Speijer, H., Giesen, P.L.A., Zwaal, R.F.A., Hack, C.E., Hermens, W.Th. 1996. Critical Micelle Concentrations and Stirring Are Rate-Limiting in the Loss of Lipid Mass during Membrane Degradation by Phospholipase A<sub>2</sub>. *Biophysical Journal.* 70: 2239-2247.
- Strichartz, G.R., Wang, G.K. 1986. Rapid voltage-dependent dissociation of scorpion β-toxins coupled to Na channel inactivation in myelinated nerve. *J. Gen. Physiol.* 88: 413 - 435.
- Teixeira, C.F.P., Zamunér, S.R., Zuliani, J.P., Fernandes, C.M., Cruz-Hofling, M.A., Fernandes, I., Chaves, F., Gutiérrez, J.M. 2003. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with bothrops asper snake venom. *Muscle Nerve* 28: 449–459.
- Tidball, J.G. 1995. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc.* 27: 1022–1032.
- Tidball, J.G. 2005. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol.* 288: 345-353.
- Torrez, P.Q.; Duarte, M.R.; França, F.O.S.; Figueiredo, L.; Abati, P.; Campos, L.R.; de Oliveira Parda, P.P.; Quiroga, M.; Mascheretti, M.; Boulos, M. 2009. First report of an accident with the speckled forest pit viper (*Bothriopsis taeniata*) in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 42(3):342-344.
- Trump, B.F., Berezesky, I.K., Osernio-Vargas, A.R. 1981. All death the disease process. The role of calcium. In: Bower, I.D., Loskshin, R.A. *Chapman death in Biology and Patology.*

- Tselin, V.I., Hucho, F. 2004. Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Lett.* 557: 9–13.
- Tu, A. T. Venoms of crotalidae (Crotalids, pit vipers). In: *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons, 1977. pp. 211.
- Turci, L.C.B., de Albuquerque, S., Bernarde, P.S., Miranda, D.B. 2009. Uso do hábitat, atividade e comportamento de *Bothriopsis bilineatus* e de *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae) na floresta do Rio Moa, Acre, Brasil. *Biota Neotrop.*, 9(3): 197-206.
- Vadas, P., Browning, J., Edelson, J., Pruzanski, W. 1993. Extracellular phospholipase A<sub>2</sub> expression and inflammation: the relationship with associated disease states. *J. Lipid Mediators* 8: 1–30.
- Vadas, P., Pruzanski, W. 1986. Role of secretory phospholipases A<sub>2</sub> in the pathobiology of disease. *Lab. Invest.* 55: 391–404.
- Verheij, H.M., Boffa, M.C., Rothen, C., Bryckert, M.C., Verger, R., de Haas, G.H. 1980a. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A<sub>2</sub>. *Eur. J. Biochem.* 112. 2532.
- Verheij, H.M., Slotboom, A.J., De Haas, G.H. 1981. Structure and function of phospholipase A<sub>2</sub>. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 91: 92–203.
- Verheij, H.M., Volwerk, J.J., Jansen, E.J.M., Poyk, W.C., Dijkstra, B.W., Drenth, J., de Haas, G.H. 1980b. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry.* 19: 743–750.
- Waldez, F., Vogt, R.C. 2009. Ecological and epidemiological aspects of snakebites in riverside communities of the lower Purus River, Amazonas, Brazil. *Acta Amaz.* 39(3), 681 – 692.
- Wang, X. 2001. Plant Phospholipase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 52: 211 – 231.
- Ward, R.J., de Azevedo Jr, W.F., Arni, R.K. 1998. At the interface: crystal structures of phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon.* 36: 1623-1633.
- Warrell, D.A. 1996. Clinical features of envenoming by snake bites. In: Bon, C., Goyffon, M. (Eds.), *Envenomings and Their Treatments*. Fondation Marcel Mérieux, Lyon, pp. 63–76.
- Wei, J.F., Li, T., Wei, X.L., Sun, Q.Y., Yang, F.M., Chen, Q.Y., Wang, W.Y., Xiong, Y.L., He, S.H. 2006. Purification, characterization and cytokine release function of a novel Arg-49 phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Protothrops mucrosquamatus*. *Biochimie.* 88(10): 1331-1342.
- White, J. 1995. Clinical toxicology of sea snakebites. In: Meier, J., White, J. (Eds.), *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Toxins*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 159–170.
- White, J.M. 2005. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon* 45: 951-967.

- Wüster, W., Harvey, A.L. 1996. Reviews of venomous snake systematics in Toxicon. Toxicon 34: 397-398.
- Wüster, W., Peppin, L., Pook, C.E., Walker, D.E. 2008. A nesting of vipers: Phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). Molecular Phylogenetics and Evolution 49: 445-459.
- Yang, C.C. 1994. Structure-function relationship of PLA<sub>2</sub> from snake venoms. J. Toxicol. Toxin Rev. 13: 125-127.
- Yang, C.C., 1997. Chemical modification and functional sites of phospholipases A<sub>2</sub>. In: Kini, R.M., (Ed.), Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function and Mechanism, Wiley, Chichester, England, pp. 185–204.
- Zammit, P.S., Beauchamp, J.R. 2001. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell?. Differentiation. 68 (4-5): 193-204.
- Zamunér, S., Gutiérrez, J.M., Muscará, M.N., Teixeira, S.A., Teixeira, C.F.P. 2001. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. Toxicon. 39: 1505–1513.
- Zhang, Q.; Wang, J.; Han, Y.; Xie, Q.; An, L.; Bao, Y. 2007. Identification of a novel thrombin-like phospholipase A<sub>2</sub> from *Gloydius ussuriensis* snake venom. Blood Coagul Fibrinolysis. 18(8): 723-729.
- Zlotkin, E., Fraenkel, F., Miranda, F., Lissitzky, S. 1971. The effect of scorpion venom on blowfly larvae-a new method for the evaluation of scorpion venoms potency. Toxicon 9: 1-8.

## VIII. Anexo



CEEA/Unicamp

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

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1492-1**, sobre "**Caracterização molecular e funcional de uma miotoxina fosfolipase A<sub>2</sub> e homóloga Lys49 de *Bothriopsis taeniata*: avaliação comparativa de suas atividades farmacológicas**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Sérgio Marangoni / Frey Francisco Romero Vargas**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **31 de março de 2008**.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1492-1**, entitled "**Molecular and functional characterization of a miotoxin phospholipase A<sub>2</sub> and homologous Lys49 of *Bothriopsis taeniata*: comparative evaluation of their pharmacological activities**", 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 **March 31, 2008**.

Campinas, 31 de março de 2008.

Prof. Dra. Ana Aparecida Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

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

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