

MAURICIO AURELIO GOMES HELENO

“Estudo das ações neurotóxicas, miotóxicas e pró-inflamatórias da PLA₂ BrTX-I, isolada do veneno de *Bothrops roedingeri* (Jérgon da Costa): Caracterização bioquímica e farmacológica *in vivo* e *ex vivo*”

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MAURICIO AURELIO GOMES HELENO

“Estudo das ações neurotóxica, miotóxica e pró-inflamatória da PLA₂ BrTX-I, isolada do veneno de *Bothrops roedingeri* (Jérgon da Costa): Caracterização bioquímica e farmacológica *in vivo* e *ex vivo*”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Mauricio Aurelio Gomes Heleno
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Sergio Marangoni

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

Orientador: Prof. Dr. Sergio Marangoni
Coorientador: Prof. Dr. Luís Alberto Ponce Soto

Campinas – SP

2012

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

Heleno, Mauricio Aurelio Gomes, 1962-

H366e Estudo das ações neurotóxica, miotóxica e pró-inflamatória da PLA₂ BrTX-I, isolada do veneno de *Bothrops roedingeri* (Jérgon da Costa) : caracterização bioquímica e farmacológica *in vivo* e *ex vivo* / Mauricio Aurelio Gomes Heleno. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

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

1. Neurotoxicidade. 2. Fosfolipase A2. 3. Inflamação. 4. *Bothrops roedingeri*. 5. Citocinas. I. Marangoni, Sergio, 1951-. II. Ponce Soto, Luís Alberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Study of neurotoxic, myotoxic and proinflammatory actions of BrTX-I PLA₂, isolated from *Bothrops roedingeri* (Jergon Coast): biochemical and pharmacological characterization *in vivo* and *ex vivo*

Palavras-chave em Inglês:

Neurotoxicity
Phospholipase A2
Inflammation
Bothrops roedingeri
Citokines

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Sergio Marangoni [Orientador]
Cleyton Crepaldi Domingues
Joao Ernesto de Carvalho
José Carlos Cogo
Thalita Rocha

Data da defesa: 09-10-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 09 de outubro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sergio Marangoni (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling

Assinatura

Prof. Dr. Joao Ernesto de Carvalho


Assinatura

Prof. Dr. José Carlos Cogo


Assinatura

Profa. Dra. Thalita Rocha


Assinatura

Prof. Dr. Cleyton Crepaldi Domingues


Assinatura

Profa. Dra. Cintia Maria Saia Cereda

Assinatura

Prof. Dr. Luís Otávio Saggion Beriam

Assinatura

À minha família, Salete, Daniel, Mariana e Vinícius, alicerce fundamental da minha vida, que me apoiou e motivou a continuar minha evolução profissional, dedico este trabalho.

À minha mãe Maria Madalena Meira Heleno, dedico este título, para seu orgulho e alegria.

Em memória de minha tia, Eliza Meira, pelo amor e fé sempre depositados em mim. Descanse em paz!

Aos que estiveram ao meu lado durante este projeto, apoiando e acreditando no meu sucesso.

Agradecimentos

À minha família, que me motivou e impulsionou para a realização de mais uma etapa no meu crescimento pessoal e profissional.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela oportunidade de crescimento científico e profissional, fundamentado no desenvolvimento acadêmico e pessoal.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni, professor titular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia por me acolher no seu laboratório e viabilizar a realização deste estudo, sempre aconselhando, estimulando e indicando o melhor caminho a percorrer.

Ao Prof. Dr. Luis Alberto Ponce Soto, amigo e coorientador, pela oportunidade, por todos os ensinamentos e atenção dedicados ao desenvolvimento deste estudo, além da confiança depositada em sua realização. Sua colaboração e amizade serão sempre lembradas.

Ao pessoal do Laboratório de Química de Proteínas (LAQUIP) pelo acolhimento, amizade e colaboração para a realização deste trabalho.

Ao Frey Francisco Romero-Vargas e ao Salomon Huancahuire-Vega pelo apoio técnico e colaboração no desenvolvimento deste estudo.

Ao Paulo Aparecido Baldasso pelo suporte técnico, companheirismo e amizade, fundamentais para o bom desenvolvimento deste e de qualquer trabalho.

À Andréia A. Vigilato dos Santos, da Secretaria de Pós-Graduação do Curso de Biologia Funcional e Molecular, pelo apoio administrativo-acadêmico para a realização deste estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro, possibilitando desta forma a realização deste trabalho.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“O homem erudito é um descobridor de fatos que já existem,
mas o homem sábio é um criador de valores que não
existem e que ele faz existir.”

Albert Einstein

ÍNDICE

	Pag.
ÍNDICE	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O veneno botrópico	3
1.2 Fosfolipase A ₂	5
1.3 Ações farmacológicas das PLA ₂	11
1.4 Miotoxinas PLA ₂	13
1.5 Neurotoxinas PLA ₂	15
1.6 Função da atividade enzimática nos efeitos farmacológicos da PLA ₂	17
1.7 <i>Bothrops roedingeri</i>	19
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Veneno e reagentes	22
3.2 Animais	22
3.3 Purificação das toxinas do veneno de <i>Bothrops roedingeri</i>	22
3.3.1 Isolamento da fração II do veneno de <i>Bothrops roedingeri</i> por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75	22
3.3.2 Purificação da PLA ₂ (BrTX-I) procedente do veneno de <i>Bothrops roedingeri</i> em HPLC de fase reversa	22
3.3.3 Repurificação da PLA ₂ procedente do veneno de <i>Bothrops roedingeri</i> em HPLC de fase reversa	23
3.3.4 Dosagem proteica pelo Método de Bradford	23
3.4 Eletroforese em SDS- PAGE	23
3.5 Análise de aminoácidos	24
3.6 Determinação da massa molecular da BrTX-I por espectrometria de massas Electrospray (ESI-MS)	24
3.7 Análise Estrutural da PLA ₂ BrTX-I	24
3.7.1 Redução e Alquilação	24
3.7.2 Hidrólise enzimática	25
3.7.3 Espectrometria de massas em tandem	25
3.7.4 Sequenciamento “de novo” dos peptídeos tripticos	25
3.8 Cinética Enzimática	26
3.8.1 Atividade Fosfolipásica A ₂	26
3.8.2 Efeito do pH na atividade PLA ₂	26
3.8.3 Efeito da temperatura na atividade PLA ₂	26
3.8.4 Efeito da concentração do substrato na atividade PLA ₂	27
3.8.5 Efeito de íons divalentes na atividade PLA ₂	27
3.8.6 Inibição da atividade enzimática da BrTX-I pela crotapotina.	27
3.9 Determinação das atividades biológicas	27
3.9.1 Medida da atividade neurotóxica em músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho	27
3.9.2 Determinação dos níveis de CK plasmáticos em camundongos inoculados pelas vias intramuscular (miotoxicidade local) e intravenosa (miotoxicidade sistêmica)	28

3.9.3 Determinação da atividade edematogênica	28
3.9.4 Dosagem das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α	29
3.10 Análise Estatística	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Purificação da PLA ₂ D49 provenientes do veneno de <i>Bothrops roedingeri</i>	31
4.1.1 Isolamento da fração II a partir de veneno total de <i>Bothrops roedingeri</i> em coluna de Cromatografia de Exclusão Molecular Sephadex G-75	31
4.1.2 Purificação em HPLC de fase reversa, da PLA ₂ presente na fração II isolada do veneno total de <i>Bothrops roedingeri</i> por exclusão molecular em Sephadex G-75	32
4.1.3 Tabela de purificação da BrTX-I	33
4.1.4 Eletroforese em PAGE- SDS da PLA ₂ BrTX-I isolada a partir do veneno de <i>Bothrops roedingeri</i>	34
4.1.5 Medida da atividade PLA ₂ do veneno total, fração II e pico II-4 (BrTX-I) do veneno de <i>Bothrops roedingeri</i>	35
4.2 Estudos cinéticos da PLA ₂ BrTX-I isolada de veneno total de <i>Bothrops roedingeri</i>	36
4.3 Análise de composição de aminoácidos da PLA ₂ BrTX-I isolada do veneno de <i>Bothrops roedingeri</i>	38
4.4 Determinação da massa molecular por Espectrometria de Massas ESI-MS (TOF)	39
4.5 Análise Estrutural de BrTX-I	40
4.6 Homologia sequencial da PLA ₂ BrTX-I isolada do veneno de <i>Bothrops roedingeri</i>	42
4.7 Caracterização biológica da PLA ₂ BrTX-I	43
4.7.1 Determinação da atividade neurotóxica “ <i>ex vivo</i> ” do veneno total e da PLA ₂ BrTX-I	43
4.7.2 Caracterização miotóxica da PLA ₂ BrTX-I de <i>Bothrops roedingeri</i> através dos níveis de CK plasmáticos “ <i>in vivo</i> ”, após administração intramuscular e intravenosa	47
4.7.3 Determinação da atividade edematogênica da PLA ₂ BrTX-I isolada do veneno de <i>Bothrops roedingeri</i>	49
4.7.4 Dosagem das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α	50
5. DISCUSSÃO	51
5.1. Purificação, caracterização físico-química e estrutural da PLA ₂ BrTX-I	51
5.2. Caracterização farmacológica <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> da PLA ₂ BrTX-I	56
5.2.1 Atividade Neurotóxica	56
5.2.2 Atividade Miotóxica	61
5.2.3 Atividade Inflamatória	63
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8. ANEXO	88

LISTA DE ABREVIATURAS

Cromatografias e Espectrometrias

ESI	Electrospray Ionization
HPLC	High Pressure/Performance Liquid Chromatography
MS	Mass Spectrometry
MS-MS	Tandem Mass Spectrometry
PDA 991	Photodiode Array Detector
RP-HPLC	Reverse Phase HPLC
Sephadex G-75	Dextran-based matrix for Gel Exclusion Chromatography
TOF	Time Of Flight
μ -Bondapack C18	18 High Carbon Load HPLC Column

Reagentes, Sais, Tampões

4N3OBA	4-nitro-3-octanoyloxybenzoic acid
ACh	Acetylcholine
AMBIC	Ammonium Bicarbonate Buffer
Buffer A	TFA 0,1% used for chromatography of RP-HPLC
Buffer B	Acetonitrile 66% used for chromatography of RP-HPLC
CK	Creatin kinase
DTT	Dithiothreitol
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TFA	Trifluoroacetic Acid
Tris	Tris(hidroximetil)aminometane

Frações, Isoformas, Serpentes

<i>B.roedingeri</i>	<i>Bothrops roedingeri</i>
<i>C.d.terrificus</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
<i>Cpt</i>	<i>Crotalus durissus terrificus crotapotin</i>
BCp	Chick biventer cervicis preparation
BrTX-I	Phospholipase A ₂ from <i>Bothrops roedingeri</i> venom
D ₄₉	Phospholipase A ₂ , Aspartate 49, catalytically active
K ₄₉	Phospholipase A ₂ , Lysine 49, catalytically inactive
PLA ₂	Phospholipase A ₂

RESUMO

Uma grande variedade de toxinas provenientes de venenos animais tem sido largamente utilizada no estudo de mecanismos de ação e processos fisiológicos, sendo consideradas valiosas ferramentas moleculares. As serpentes peçonhentas expressam no veneno diversas proteínas muito estudadas e utilizadas clinicamente, apresentando diferentes graus de variabilidade inter e intraespecífica em suas composições e nos seus efeitos biológicos. O conhecimento obtido com os estudos destas moléculas tem grande importância clínica na compreensão dos processos fisiopatológicos envolvidos nos envenenamentos ofídicos e também acadêmico-tecnológica, devido à possibilidade do desenvolvimento de novos instrumentos moleculares utilizados na pesquisa e também de novos modelos moleculares para princípios ativos de drogas. Neste trabalho pesquisamos as atividades neurotóxica, miotóxica e inflamatória de uma PLA₂ básica, D49, purificada do veneno da serpente *Bothrops roedingeri* após duas etapas cromatográficas, exclusão molecular em Sephadex G-75 e hidrofobicidade em HPLC de fase reversa em coluna μ -Bondapak C-18. A BrTX-I apresentou massa molecular relativa em torno de ~14 kDa (SDS-PAGE) e confirmada por espectrometria de massas (ESI-MS), em 14.358,69 Da. A análise da composição de aminoácidos da BrTX-I, revelou que esta é constituída aproximadamente por 120 resíduos aminoácídicos, com alto conteúdo de aminoácidos básicos e hidrofóbicos, resultando em um valor calculado de pI de 8,63. A presença de 14 resíduos de cisteína sugere a formação de sete pontes dissulfeto. A análise estrutural da BrTX-I foi realizada por ESI-MS e as regiões analisadas mostraram semelhança com outras PLA₂ miotóxicas isoladas de venenos botrópicos. A BrTX-I apresentou alta atividade PLA₂ e um comportamento tipo sigmoideal em baixas concentrações do substrato. Atividade PLA₂ ótima da BrTX-I foi em pH 8,0 e temperatura de 37 °C. A BrTX-I mostrou-se dependente de Ca²⁺ (mM) e na sua substituição por Zn⁺², Mn⁺², Mg⁺² e Cd⁺² a atividade foi reduzida. O estudo da homologia sequencial da BrTX-I mostrou posições extremamente conservadas na molécula. Nas posições 1 e 2 há predominância da sequência de aminoácidos (DL), na posição 4 (Q). Uma das regiões altamente conservadas na sequência de aminoácidos das PLA₂ é a alça de ligação ao cálcio, segmento ...YGCYCGXGG. Resíduos formando a alça de ligação ao cálcio e a rede catalítica

da BrTX-I mostraram um alto grau de conservação, refletindo na manutenção da atividade. A região relacionada à atividade neurotóxica pré-sináptica (80-110) apresentou principalmente resíduos hidrofóbicos. Em preparações *ex vivo*, o veneno e a BrTX-I causaram rápido bloqueio da neurotransmissão na preparação biventer cervicis de pintainho de modo similar a outras *Bothrops*, sem alterar significativamente as respostas contraturantes à adição de ACh e de KCl (5 e 20 $\mu\text{g/mL}$), indicando atividade neurotóxica pré-sináptica. Em camundongos, a BrTX-I induziu miotoxicidade local, determinada pelo aumento nos níveis plasmáticos de CK e mostrou efeito pró-inflamatório analisado através da formação do edema de pata e liberação das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α . Como BrTX-I produz um efeito inflamatório, a hidrólise de fosfolípidios pode ser relevante na fisiopatologia do envenenamento.

ABSTRACT

A great variety of animal venom toxins has been widely used in the study of action mechanisms and metabolic processes, thus considered valuable molecular tools. Poisonous snakes contains in their venom several well studied and clinically used proteins, showing these venoms different intra or interspecific variability degrees in their composition and biological effects. The knowledge obtained with these molecules study, has a great clinical relevancy understanding pathophysiological process regarding snake envenomations, and also academic-technological, due to the possibility to develop new molecular tools and new molecular models to study active principles of some drugs. In this work, we study neurotoxic, myotoxic and inflammatory activities of BrTX-I, a basic PLA₂, purified from *Bothrops roendigeri* snake venom after two chromatographic steps, using molecular exclusion chromatography (Sephadex G-75) and reverse phase HPLC on μ -Bondapak C-18 column. BrTX-I showed relative molecular mass around 14 kDa (PAGE) and specific molecular mass of 14,358.69 Da was determined by ESI-MS mass spectrometry. The amino acid composition analysis showed that BrTX-I contains 120 aminoacidic residues with high content of basic and hydrophobic amino acids, resulting in a calculated *pI* value of 8.63. The presence of 14 Cysteine residues, suggests the formation of seven disulfide bonds. Structural analysis of BrTX-I PLA₂, performed by ESI-MS showed high identity values when compared to other myotoxic PLA₂, isolated from *Bothrops* snakes venoms. BrTX-I presented high PLA₂ activity and showed a sigmoidal behavior at low substrate concentrations. The BrTX-I reached its maximal PLA₂ activity at pH 8.0 and 37 °C. Maximum PLA₂ activity required Ca²⁺ (mM) and substitution of Ca²⁺ by Zn²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ or Cd²⁺ showed reduced enzymatic activity. Sequence homology studies of BrTX-I showed extremely conserved positions in the molecule. In positions 1 and 2, there is a predominance of the amino acids sequence (DL), and in position 4 (Q). One of the highly conserved regions in the amino acid sequences of PLA₂ is the Ca²⁺-binding loop, segment ...YGCYCGXGG. Residues forming the Ca²⁺-binding loop and the catalytic network of BrTX-I PLA₂ showed a high conservation grade, reflecting the non-decreased catalytic activity. The region related to the presynaptic neurotoxic activity (80-110), showed mainly the presence of hydrophobic residues. In *ex vivo* studies, the whole venom and BrTX-I caused a fast blockade of the neuromuscular transmission in young chick biventer cervicis preparations

in a similar way to other *Bothrops* species, without alters significantly the contractures induced by ACh and KCL at doses of 5 and 20 µg/mL, respectively, indicating presynaptic neurotoxic activity. In mice, BrTX-I induced local myotoxicity, determined by increase in CK serum levels, and showed proinflammatory effects analyzed through edema-forming activity and cytokines IL-1, IL-6, and TNFα release. Once BrTX-I induces a strong pro-inflammatory effect, the enzymatic phospholipid hydrolysis may be relevant for envenomation pathophysiology.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem se valorizado o uso de moléculas provenientes de venenos. É provável que o isolamento de toxinas dos venenos de serpentes que atuam seletivamente sobre determinados canais iônicos ou sobre o sistema hemostático (Markland, 1998), como instrumentos moleculares para o desenvolvimento de novas pesquisas, agentes terapêuticos como o Captopril, que foi sintetizado a partir do modelo molecular de um peptídeo isolado do veneno de *Bothrops jararaca* (Harvey et al., 1998; Ferreira, 2000) e moléculas antitrombóticas purificadas e caracterizadas devido à alta eficácia que apresentam no processo de dissolução de trombos (Xiuxia et al., 2002; Bortoleto et al., 2002), tenham atraído a atenção de muitos pesquisadores. O interesse comercial na atualidade é de estudar modelos aperfeiçoados pela natureza para desenvolver novos medicamentos para uso clínico, para o tratamento de infarto do miocárdio, hematomas ou embolia pulmonar (Markland, 1998).

As atuais descobertas também têm sido utilizadas para o desenvolvimento de novos protocolos de tratamento do envenenamento ofídico ou para explicar os efeitos fisiopatológicos do veneno de serpentes (Gutiérrez et al., 2010). O envenenamento causado pelos acidentes ofídicos é um evento comum nos países das regiões tropical e subtropical. Os acidentes ofídicos têm importância médica em virtude de sua grande frequência e gravidade (FUNASA, 2001). Mundialmente, o envenenamento por serpentes é um problema maior na Ásia, África, Oceania e em várias regiões da América Latina, como é o caso das ilhas do Caribe, Brasil e Peru. A exatidão do número de casos é discutível, como fica ilustrado em um estudo dos anos 50, que sugere uma mortalidade anual de 25 a 30 mil pessoas no mundo. No entanto, estes dados parecem não representar a real magnitude do problema, pois se acredita que a mortalidade anual apenas na Ásia chegue a ser de até 100 mil pessoas (Gutiérrez et al., 2008).

No Brasil, foram notificados à FUNASA, no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993, 81.611 acidentes, o que representa uma média de 20.000 casos/ano para o país. De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, neste período, os acidentes com espécies do gênero *Bothrops* totalizaram aproximadamente 90 % dos acidentes ofídicos envolvendo gêneros suspeitos ou conhecidos e cerca de 70 % dos envenenamentos ofídicos em geral (FUNASA, 2001). Outro país da América Latina que apresenta alta incidência de acidentes ofídicos é o Peru (Zavaleta e Salas, 1996). Este país possui uma herpetofauna rica e diversificada que inclui espécies da família Elapidae (gênero *Micrurus*) e Viperidae (gêneros *Bothrops*, *Crotalus*,

Lachesis). As zonas rurais da costa norte deste país, também apresentam frequentes casos de envenenamentos ofídicos. (Campbell e Lamar, 2004).

Na América Latina os envenenamentos por viperídeas, caracterizam-se por uma fisiopatologia complexa, que inclui efeitos locais (mionecrose, dermatonecrose, hemorragia, edema, dor) e em casos moderados e severos, alterações sistêmicas como coagulopatias, hemorragia, choque hipovolêmico, neurotoxicidade e insuficiência renal aguda.

As principais complicações em casos letais são insuficiência renal aguda (IRA), choque hipovolêmico, insuficiência respiratória aguda e septicemia (Amaral et al., 1985; Ribeiro et al., 1998). Em alguns casos, a insuficiência respiratória foi associada a edema pulmonar (Ribeiro et al., 1998).

Provavelmente, a exceção a esse padrão fisiopatológico se encontre no caso de algumas cascavéis sul-americanas, especialmente a *Crotalus durissus terrificus*, cujo veneno induz a alterações locais irrelevantes, caracterizando-se bem mais por potentes atividades neurotóxicas e miotóxicas sistêmicas do que por alterações locais e de coagulação. Os venenos das serpentes corais (*Micrurus* sp) e da serpente marinha *Pelamis platurus* (família Hydrophiidae) induzem unicamente um efeito neurotóxico, sem ocasionar alterações locais relevantes, do ponto de vista clínico. Experimentalmente se tem evidenciado que os venenos das serpentes corais induzem um efeito miotóxico em camundongos, embora este efeito não pareça ser relevante no envenenamento humano.

Os efeitos locais induzidos por venenos de viperídeos constituem um problema relevante por várias razões:

1) Desenvolvem-se muito rapidamente após a inoculação do veneno, o que dificulta a sua neutralização, se o soro antiofídico for administrado várias horas após o acidente ofídico.

2) Afetam drasticamente o tecido muscular, os vasos sanguíneos e a pele, induzindo lesões que, com frequência, deixam sequelas.

3) Frequentemente se complicam com infecções, o que dificulta ainda mais o manejo do quadro clínico.

4) Em alguns casos severos, desencadeia-se uma síndrome compartimental, exigindo a cirurgia de retirada do tecido já necrosado (fasciotomia), o que complica o tratamento e prolonga a permanência do paciente no hospital.

5) A experiência clínica mostra que estes efeitos locais são difíceis de neutralizar pelos soros antiofídicos conhecidos e por outros recursos terapêuticos complementares.

A figura 1 sintetiza o que foi exposto acima. 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).

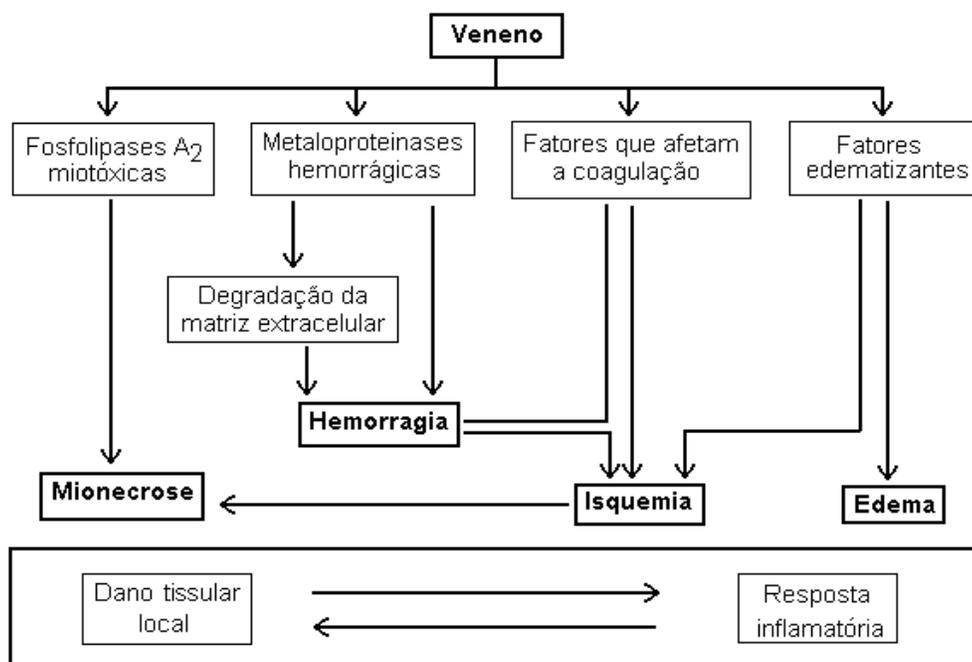


Figura 1. Hipóteses sobre o desenvolvimento dos efeitos locais induzidos por venenos das serpentes da família Viperidae (Adaptado de Gutiérrez e Lomonte, 2003).

1.1 O veneno botrópico.

Os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* causam intensa dor local, às vezes com hemorragia e necrose tecidual tão grave que requer a amputação do órgão atingido (Brazil e Pestana, 1909; Jiménez - Porras, 1973). Os venenos destas serpentes também são responsáveis por diversos outros efeitos tais como: coagulação sanguínea, choque hipovolêmico, hemorragias, insuficiência renal e liberação de compostos farmacologicamente ativos, semelhantes à histamina e bradicinina (Rothchild e Rothchild, 1979).

As serpentes do gênero *Bothrops* possuem venenos com ação proteolítica, coagulante e vasculotóxica:

Ação Proteolítica: Decorre da ação citotóxica direta nos tecidos por frações proteolíticas do veneno (proteases, hialuronidases e fosfolipases) e da liberação de mediadores da resposta

inflamatória. Essa ação tem patogênese complexa e se relaciona com a quantidade de veneno inoculado, podendo haver mionecrose e lise das paredes vasculares (FUNASA, 2001)

Ação Coagulante: O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* tem a propriedade de transformar diretamente o fibrinogênio em fibrina, além de ativar a protrombina e o fator X da cascata de coagulação sanguínea. A fração da peçonha que possui esta ação coagulante atua de maneira diferente da trombina fisiológica, pois não é neutralizada pela heparina. Os venenos botrópicos podem também levar a alterações da função plaquetária bem como plaquetopenia (FUNASA, 2001).

Ação Hemorrágica: Esta ação, quando sistêmica, é causada por fatores hemorrágicos denominados hemorraginas. Estas agem sobre vasos capilares, destruindo inicialmente a lâmina basal e causando sua posterior ruptura. A ação das hemorraginas explica casos de hemorragias sistêmicas, algumas vezes fatais, que ocorrem no cérebro, afetando o funcionamento do sistema nervoso central (FUNASA, 2001).

Apesar dos venenos botrópicos não produzirem sinais de neurotoxicidade após a picada, nos últimos anos venenos de diversas espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, tem demonstrado afetar a transmissão neuromuscular em preparações neuromusculares isoladas de aves, anfíbios e mamíferos. Esses efeitos e informações a respeito de sua ação neurotóxica, foram obtidos através de estudos miográficos e eletrofisiológicos. A capacidade neurotóxica de certos componentes presentes nos venenos botrópicos já foi descrita desde o trabalho pioneiro de Rodrigues-Simioni et al.(1983).

Estes autores, realizando testes em preparações neuromusculares de rã, descreveram os efeitos da principal fração ativa isolada do veneno total de *Bothrops jararacussu*, por cromatografia em Sephadex G 150 e denominada, naquela fase do estudo, de pool IV (posteriormente denominada fração IV por Homsí-Brandeburgo et al., 1988). O efeito neurotóxico acima citado foi atribuído à fração IV. Posteriormente esta fração foi denominada Bothropstoxina (BthTX). A Bothropstoxina foi purificada em dois processos cromatográficos: o primeiro, correspondendo à fração SIII; e o segundo, à S_{III}-SP_{IV}, sendo esta caracterizada e sequenciada por Cintra et al. (1993) como uma fosfolipase A₂ Lys49. Heluany et al. (1992) evidenciaram o efeito neurotóxico da BthTX sobre as preparações *ex vivo* biventer cervicis de pintainho e nervo frênico-diafragma de camundongo.

Costa et al. (1999) evidenciaram que a peçonha de *Bothrops pirajai* possui um efeito miotóxico e neurotóxico, capaz de bloquear a resposta contrátil na preparação extensor digitorum longus (EDL) de rato. Soares et al. (2000b) caracterizaram uma neurotoxina miotóxica, BnSP-7, uma fosfolipase A₂ Lys49 de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Prado-Franceschi. et al. (1998), caracterizaram uma miotoxina com atividade neurotóxica de *Philodryas olfersii* (cobra verde), uma serpente da família Colubridae, considerada não peçonhenta, mas agressiva. Trata-se de uma proteína ácida de 20 kDa e um pI em torno de 4,8.

Em estudo de 1996, Fontana e colaboradores demonstraram a especificidade da neurotoxicidade para aves e anfíbios, de uma proteína básica de massa molecular entre 14-18 kDa, presente na secreção da glândula de Duvernoy (salivar) da serpente não peçonhenta *Dryadophis bifossatus bifossatus* (jararacussú-do-brejo), da família Colubridae. Esta neurotoxina atua especificamente sobre o receptor colinérgico nicotínico da placa motora terminal da fibra muscular. Este estudo indica que serpentes não peçonhentas também podem possuir proteínas com ação neurotóxica pós-sináptica como as elapídeas. Uma comparação entre as neurotoxinas das colubrídeas e as neurotoxinas pós-sinápticas das elapídeas merecem estudos posteriores, uma vez que ambas apresentam mecanismos de ação farmacológica semelhantes.

1.2 Fosfolipase A₂

As fosfolipases A₂ (PLA₂) (E.C.3.1.1.4), são enzimas dependentes de cálcio, que catalisam a hidrólise de 1,2-diacil-3-*sn*-glicerol dos fosfoglicerídeos e amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em bactérias, insetos, répteis, tecidos de mamíferos (pulmão, fígado, baço, coração, eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleares) e há mais de uma década evidenciou-se a presença de PLA₂ em *Pinus americanus* (Valentin e Lambeau, 2000). No entanto, as mais conhecidas e amplamente estudadas são aquelas encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos e nos venenos de serpentes e insetos (Verheij, et.al., 1980).

Essas PLA₂ apresentam alta homologia sequencial e estão relacionadas evolutivamente, formando a superfamília das PLA₂ de baixo peso molecular divididas nos grupos I e II, segundo Dennis (1994). De acordo com Kini (2003), as PLA₂ procedentes de veneno de serpentes compartilham uma similaridade em estrutura e função com as enzimas de mamíferos. No entanto, dentre as PLA₂ de veneno de serpentes, muitas são tóxicas e induzem um amplo espectro de efeitos farmacológicos.

As PLA₂ de venenos (secretórias) são proteínas de baixo peso molecular, constituídas por cerca de 120-135 resíduos de aminoácidos, com uma massa molecular de aproximadamente 13 a 15 kDa, várias pontes dissulfeto, uma alta conservação da estrutura tridimensional e são produzidas e secretadas por células (Valentin e Lambeau, 2000). Estudos com mais de 50 PLA₂ de diferentes filós revelaram características em comum tais como baixa massa molecular (14 kDa), uma α -hélice amino terminal anfipática, um “loop” para ligação de Ca²⁺, um sítio ativo e um grande número de pontes dissulfeto intramoleculares (geralmente sete, mas existem variações). Estas PLA₂ são geralmente termoestáveis e requerem concentrações milimolares de Ca²⁺ para a atividade catalítica ótima.

As PLA₂ pancreáticas de mamíferos são produzidas e secretadas como zimogênios, com a presença de um heptapeptídeo na região N-terminal na enzima inativa. Contudo, no caso das serpentes ou de outros animais peçonhentos, diversas isoformas de PLA₂ são constantemente sintetizadas. As isoformas (PLA₂-like ou PLA₂ Lys49) geralmente apresentam graus diferenciados de atividade enzimática (sendo algumas cataliticamente inativas, segundo Gutiérrez e Lomonte, 1995) e de atividade farmacológica, podendo esta última ser ou não dependente da atividade enzimática, como evidenciados para as miotoxinas K49, que exibem várias atividades farmacológicas, desde a atividade neurotóxica, cardiotoxica, nefrotóxica, mionecrótica, anticoagulante, convulsionante, hipertensiva e edematogênica. Estas PLA₂ K49 diferentemente das PLA₂ D49 (cataliticamente ativas) são capazes de desencadear suas atividades biológicas independentemente da liberação do ácido araquidônico.

As PLA₂ Asp49 são enzimas com atividade catalítica, onde o oxigênio do grupo carboxila contribui para a ligação do cofator Ca⁺² essencial na fixação do fosfato e estabilização da carga negativa do oxigênio do grupo carbonil da ligação éster na posição *sn*-2 do substrato (van den Bergh et al., 1988). Estas moléculas são enzimas que desempenham importante papel no metabolismo de lipídios com grande afinidade estereo específica para hidrólise de 1,2-diacil-3-*sn*-glicerol de membrana na posição *sn*-2, sendo, portanto, denominada de PLA₂ (Dennis, 1994 e Dennis, 1997). O mecanismo catalítico das PLA₂ envolve uma interação altamente específica com fosfolipídios.

Nesta catálise há participação do cálcio como cofator, do sítio ativo da PLA₂ e de uma molécula de água. Esta hidrólise libera lisofosfolipídeos e ácidos graxos. O ácido graxo é o ácido araquidônico, que uma vez liberado da posição *sn*-2 dos fosfolipídios de membrana pela ação da

PLA₂, pode ser metabolizado tanto pela lipooxigenase como por uma das isoformas da ciclooxigenase, formando leucotrienos e prostanóides respectivamente (Dennis, 2000).

De acordo com Kini (1997) as PLA₂ procedentes de venenos de serpentes possuem a capacidade de se unir a um “sítio específico”, devido à sua alta afinidade em se ligar a proteínas específicas que atuam como receptores ou aceptores. Essa ligação específica da PLA₂ ocorre pela presença de um sítio “farmacológico” em sua superfície, que é independente do sítio catalítico. Além destes mecanismos, recentemente, nestas últimas décadas, receptores de proteínas PLA₂ secretórias e de venenos têm sido identificados em mamíferos, sugerindo que as PLA₂ do veneno possam exercer sua toxicidade através da interação com proteínas, que seriam, portanto, os mesmos receptores para as PLA₂ secretórias produzidas pelos mamíferos, além da atividade enzimática (Kini, 1997).

As PLA₂ fazem parte de uma superfamília de proteínas que tem sido caracterizada como uma importante família de enzimas transdutoras de sinal, atuando como proteínas que interagem de forma específica com receptores em vários tecidos, inclusive em sinaptosomas de cérebro de rato (Tipo-N) e em cultura de células de músculo esquelético (Tipo-M) (Valentin e Lambeau, 2000) ou como efetores de atividades biológicas intracelulares (Dennis, 1997). A interação de alta afinidade da PLA₂ com seu acceptor (proteína alvo) deve-se, provavelmente, à complementaridade de carga, hidrofobicidade e forças de Van der Waals, que se dão entre o sítio farmacológico e o sítio alvo na superfície do receptor proteico ou acceptor. A identificação dos sítios farmacológicos tem o potencial para a exploração no desenvolvimento de novos sistemas úteis, devido ao amplo espectro de especificidade em tecidos e órgãos, para o “direcionamento” de proteínas específicas a um tecido alvo ou órgão em particular.

De acordo com a literatura, as PLA₂ são muito mais que simplesmente enzimas hidrolíticas, as pesquisas recentes buscam os novos papéis das PLA₂ intracelulares, no entanto, várias enzimas secretadas têm sido registradas na maioria das células. Também têm sido encontrados vários novos papéis das PLA₂ de venenos, que diferem consideravelmente das PLA₂ secretadas. A extensa literatura sobre PLA₂ indica a importância destas enzimas para muitas áreas de pesquisa em bioquímica, biologia molecular, biologia estrutural, toxicologia e medicina.

Classificação das Fosfolipases.

As fosfolipases são classificadas dependendo de sua estrutura, do seu mecanismo e sítio de hidrólise sobre o fosfolípídeo. Podendo desta forma, serem inicialmente classificadas em Fosfolipase A₁, Fosfolipase A₂, Fosfolipase C e Fosfolipase D (figura 2).

No caso das PLA₂, estas também podem ser classificadas segundo algumas características tais como, localização celular (secretórias ou citosólicas), de acordo com a massa molecular (de alta ou baixa massa), dependência ou não de cálcio para sua atividade enzimática, especificidade de substrato, estrutura primária e de acordo com o número de pontes dissulfeto. Desta forma as PLA₂ conhecidas até o presente momento podem ser colocadas em algumas das classes de PLA₂.

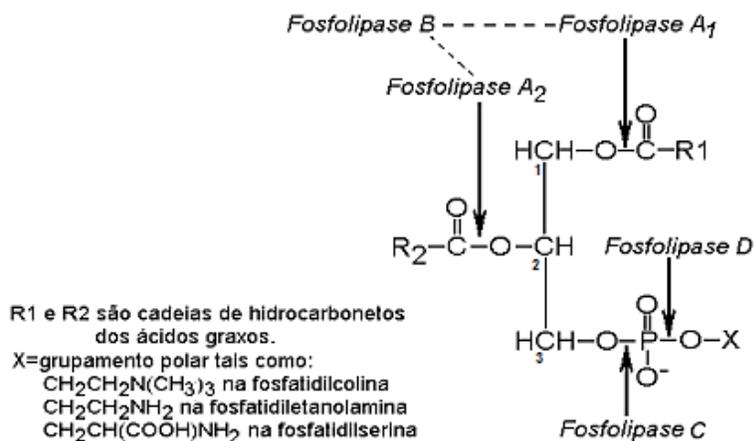


Figura 2. Principais classes de fosfolipases e seus respectivos sítios de atuação catalítica. (Adaptado de Kini, 1997)

Nos venenos, de uma forma geral, existem três grandes grupos de PLA₂ (figura 3) denominadas de PLA₂ secretórias grupo I, grupo II e grupo III, sendo que as PLA₂ pertencentes ao grupo I, são encontradas em venenos de serpentes das subfamília Elapinae e Hydrophiinae, também pertencendo a este grupo as PLA₂ pancreáticas. As PLA₂ do grupo II são encontradas em venenos de serpentes das subfamílias Crotalinae e Viperinae e são estruturalmente relacionadas às PLA₂ secretórias pancreáticas de mamíferos e de PLA₂ secretórias presentes em fluidos sinoviais

(Yang et al., 1994). No grupo III estão as PLA₂ provenientes dos venenos de abelhas e de lagartos, caracterizados por sua forte atuação neurotóxica (Scott et al., 1990).

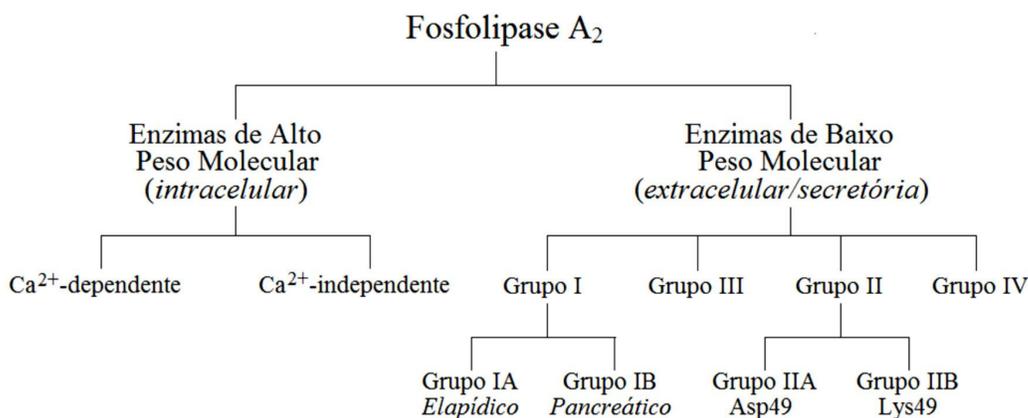


Figura 3. Classificação de enzimas PLA₂. (Adaptado de Kini, 1997)

Estrutura e função das Fosfolipases A₂

Já foram caracterizados mais de 100 membros da família de PLA₂ secretórias que são capazes de hidrolisar glicerofosfolípeios contendo um grupamento éster de fosforilcolina, etanolamina, inositol e glicerol, em ácido fosfatídico livre. A hidrólise de glicerofosfolípeios esterificados com fosfatidilcolina, etanolamina ou inositol gera dois produtos extremamente importantes, o lisofosfolípido que dará origem ao fator de agregação plaquetária e o ácido araquidônico que é um precursor de lipídios bioativos tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, sendo que há evidências de que estas enzimas poderiam também atuar em respostas imunológicas, inflamações, proliferação celular e vasoconstrição (Chang et al., 1973). Desta forma as PLA₂ induzem a produção tecidual de vários tipos de lipídios biologicamente ativos, que irão então induzir os diferentes tipos de atividades farmacológicas.

As PLA₂ dos venenos de serpentes são proteínas secretórias pertencentes aos grupos I e II (figura 3). 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 seis subgrupos (IIA-IIF), englobando as PLA₂ 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), conforme a tabela 1. Devido ao constante

avanço de técnicas de sequenciamento de aminoácidos e caracterização estrutural, novas PLA₂ foram e continuam sendo descobertas, necessitando-se de constante revisão bibliográfica para atualização de seus grupos e subgrupos.

As enzimas de classes I e II, apesar de possuírem origens filogenéticas distintas, possuem uma estrutura terciária com os mesmos motivos estruturais, que incluem a presença de três segmentos em alfa hélice, a presença de alças e folhas beta (figura 4A). As PLA₂ das classes I e II contém um íon de cálcio coordenado dentro desta estrutura que é definido como core hidrofóbico, onde está localizado o sítio catalítico destas moléculas. Este canal ou core hidrofóbico formado pela hélice encontra-se aberto à superfície externa da molécula e durante a atividade enzimática é ocupado pelas cadeias acilas do substrato (Arni e Ward, 1996).

Estas enzimas possuem um “loop” ou alça de ligação do íon cálcio (figura 4B), denominado de “calcium-binding loop” que possui uma sequência consenso de glicinas que conferem a este loop uma grande flexibilidade estrutural, que permite três átomos de oxigênio das carbonilas proximais para coordenação molecular primária do cálcio. Além disso, o resíduo carboxila do Asp 49 participa secundariamente da coordenação do cálcio (Rigden et al., 2003).

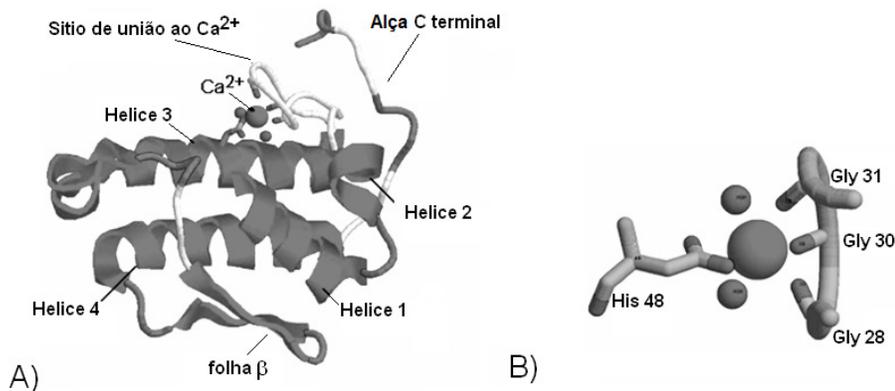


Figura 4. Em A, a estrutura terciária da PLA₂ de *Bothrops pirajai*, destacando-se a localização das estruturas secundárias desta molécula. 4B mostra detalhes da ligação do cálcio e sua coordenação com a alça de ligação do cálcio e com a His 48 (Adaptado de Rigden et al., 2003).

Tabela 1. Classificação das PLA₂ segundo Six e Dennis (2000).

Grupo	Origem	Localização	Tamanho (kDa)	Requerimento de Ca ²⁺	Nº de Pontes dissulfeto	Características moleculares
I						
A	Elapídico e Hidrofílico	Secretada	13-15	mM	7	Par His-Asp
B	Pâncreas suíno/humano	Secretada	13-15	mM	7	Par His-Asp, alça elapídica
II						
A	Crotálicas, fluido sinovial humano e plaquetas.	Secretada	13-15	mM	7	Par His-Asp, C-terminal.
B	Víbora de Gaboon	Secretada	13-15	mM	6	Par His-Asp, C-terminal.
C	Testículo de rato	Secretada	15	mM	8	Par His-Asp, C-terminal.
III	Abelha e lagartos	Secretada	16-18	mM	5	Par His-Asp, C-terminal.
IV	Rim de rato novo 264.7 Plaquetas humanas U937	Citosólica	85	<µM		Ser-228 na seqüência consenso GLSGS. Arg-200, Asp-549. Ser-505 fosforilação do sítio; Domino do sítio CaL B
V	Humano/rato/coração de camundongo, pulmão e macrófagos P388D1	Secretada	14	mM	6	Par His-Asp alça não elapídica e não C-terminal.
VI	Macrófagos da linhagem celular P388D1	Citosólica	80-85	-		Seqüência consenso repetida GX SXG Complexos de 340 kDa
VII	Plasma humano	Secretada	45	-		Seqüência consenso, GX SXG Ser-273, Asp-296, His-351
VIII	Cérebro bovino	Citosólica	29	-		Ser-47
IX	Caracol marinho	Secretada	14	<mM	6	Par His-Asp

As PLA₂ classe I e II também possuem uma estrutura em folhas β antiparalelas conservadas, que formam a β-Wing, apesar desta estrutura secundária não participar da catálise, esta estrutura tem sido relacionada a várias atividades farmacológicas tais como neurotoxicidade, miotoxicidade ou atividade anticoagulante (Gutiérrez et al., 2008).

1.3 Ações farmacológicas das PLA₂

As PLA₂ de serpentes exercem vários efeitos farmacológicos tais como: neurotoxicidade pré e pós-sináptica, miotoxicidade, atividade anticoagulante, convulsionante, hipotensiva, hemolítica, hemorrágica e edematogênica (Kini e Iwanaga, 1986; Kini e Evans, 1987).

Além das PLA₂ cataliticamente ativas (Asp49) existem outras que são definidas conforme a sua natureza molecular como proteínas com estrutura molecular similar às das PLA₂ (Asp49). São PLA₂ homólogas (Lys49) desprovidas de atividade catalítica (Ward et al., 2002), portanto para desencadear suas atividades biológicas dependem de outros mecanismos, que são independentes da liberação do ácido araquidônico (Maraganore, et al., 1984; Gutiérrez e Lomonte, 1995; Arni e Ward, 1996 e Selistre et al., 1996).

Segundo Gutiérrez e Lomonte (1995) as PLA₂ poderiam se ligar a determinados sítios da membrana com uma carga parcial negativa, que poderiam servir de ancoragem para as PLA₂. Unidas assim à membrana celular, poderiam gerar uma desorganização da membrana levando à alteração na permeabilidade e consequente destruição celular devido preferencialmente à desorganização celular mais do que pela toxicidade da PLA₂.

O motivo que reforçaria a desorganização gerada pela PLA₂, poderia ser a própria fluidez da membrana, sendo que alguns autores sugerem uma ligação ao próprio lipídio da membrana (Gutiérrez e Lomonte, 1995).

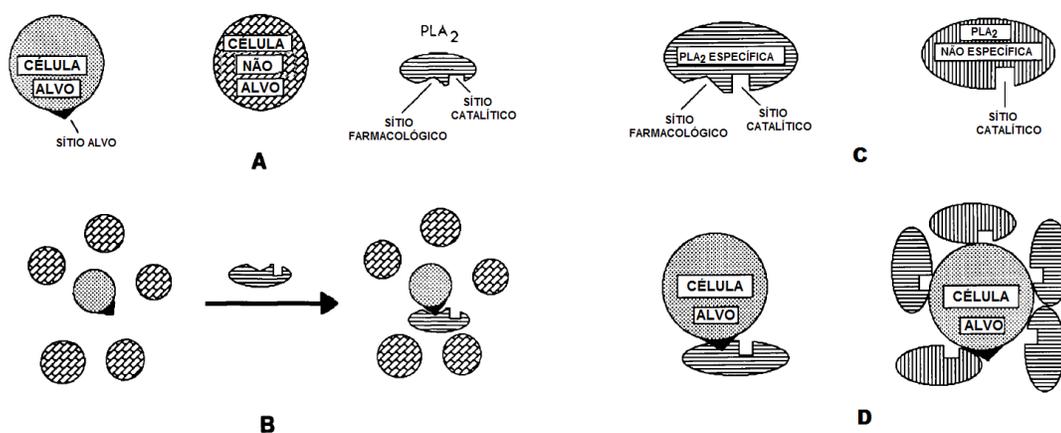


Figura 5. Interação das Fosfolipases com as células alvo. Em A, vemos que a diferença entre a célula alvo e a célula não alvo para a PLA₂ é a presença de um sítio-alvo na membrana. A PLA₂ tem um sítio farmacológico complementar ao sítio catalítico. Em B, temos a interação específica da PLA₂ e a célula-alvo, devido à alta afinidade com o sítio-alvo. Em C, observamos os modelos da PLA₂ específica e da inespecífica, que não apresenta sítio farmacológico. Em D, vemos as interações específicas e inespecíficas das PLA₂ com a célula-alvo (Adaptado de Kini, 1997).

O fundamento, segundo o esquema da figura 5, está na capacidade de certas PLA₂ interagirem especificamente com determinadas células, através de “sítios-alvo”. O sítio-alvo da célula e o sítio farmacológico da molécula devem ser complementares um ao outro na densidade de distribuição de cargas, hidrofobicidade e conformação, apresentando assim uma alta afinidade de ligação. As PLA₂ não específicas podem interagir ao acaso com todos os tipos de células incluindo as células-alvo. Assim o efeito farmacológico produzido pela interação da PLA₂ não específica é menos potente do que numa interação específica (Kini, 1997).

Todas essas atividades farmacológicas associadas a um tipo de macromolécula como as PLA₂, não dependem do mecanismo clássico de quebra do fosfolipídio. São, portanto, mecanismos independentes da atividade catalítica (Gutiérrez e Lomonte, 1995).

1.4 Miotoxinas PLA₂

Miotoxinas podem ser definidas como componentes naturais (pequenas proteínas ou peptídeos), presentes nos venenos que podem agir localmente, danificando as fibras musculares irreversivelmente (mionecrose) no local da picada e ao redor. Outras miotoxinas agem sistematicamente, causando dano muscular em sítios distantes, sendo que a miotoxicidade sistêmica pode provocar mioglobinúria e insuficiência renal aguda (IRA), uma *causa mortis* frequente por envenenamento ofídico (Azevedo-Marques et al., 1985).

As miotoxinas PLA₂ são de dois tipos: neurotóxicas e não neurotóxicas (Lomonte et al., 2003). As não neurotóxicas podem ser Asp 49 ou Lys49 (Mebs e Ownby, 1990).

As miotoxinas PLA₂ neurotóxicas são encontradas comumente nos venenos de elapídeos onde possuem o papel principal na letalidade. Os valores de DL₅₀ são extremamente baixos, devido ao potente efeito pré-sináptico na junção neuromuscular (Rosenberg, 1990), mas também podem ser encontradas em venenos de viperídios, como por exemplo, a crotoxina da *C. d. terrificus*.

No caso das miotoxinas PLA₂ não neurotóxicas, que são os componentes mais abundantes nos Viperídios, estas apresentam altos valores de DL₅₀ (Gutiérrez et al., 1986b; Rosemberg, 1990; Soares et al., 2000 a,b), sua potência miotóxica é menor quando comparada com as PLA₂ neurotóxicas. Mas devido a sua quantidade abundante nestas peçonhas, no caso dos acidentes, estas são as principais toxinas envolvidas no desenvolvimento da rabdomiólise, que é definida

como a hidrólise específica do tecido muscular, como ocorre por ação do veneno de *C. d. terrificus*.

Os modos de ação das PLA₂ miotóxicas Lys49 e as Asp49 no músculo ocorrem por vias diferentes, mas em geral podem causar lise rápida do sarcolema (membrana plasmática da fibra muscular) e um rápido estado de mionecrose (Fletcher et al., 1996).

Várias miotoxinas isoladas na década de 90, foram caracterizadas como proteínas básicas de massa molecular em torno de 13 kDa. São as miotoxinas PLA₂ homólogas, que também se caracterizam pelo seu forte caráter associativo em dímeros, que é a forma mais comum de polimerização encontrada para as PLA₂ miotóxicas e eventualmente, em tetrâmeros. Estas associações são principalmente dependentes de resíduos de tirosina (Y). (Arni e Ward, 1996).

As miotoxinas isoladas até o presente momento são moléculas compactas, estáveis às variações de temperatura, pH, concentração salina alta e na presença de solventes orgânicos. Devido a estas características, as PLA₂ miotóxicas não se desnaturam em condições usuais de trabalho, durante os processos de purificação e testes biológicos (Gutiérrez e Lomonte, 1995 e Toyama et al., 1995). Estas características são acentuadas principalmente quando as PLA₂ se encontram associadas, por exemplo, em dímeros.

As PLA₂ miotóxicas tem sido objeto de muitos estudos, pois correspondem a cerca de 20 a 30% do veneno total, sendo as toxinas mais abundantes que existem no veneno das serpentes. O estudo das PLA₂ com atividade miotóxica e farmacologicamente ativas tem contribuído para o conhecimento deste modelo biológico.

As PLA₂ de venenos apresentam alta homologia estrutural e mesmo assim apresentam diferentes ações biológicas, desde sua atividade tóxica até os eventos farmacológicos. Dentre todas as atividades, a miotoxidade é a menos conhecida de todas (Selistre et al., 1996).

As atividades miotóxica e neurotóxica não dependem inteiramente da atividade fosfolipásica A₂ (atividade enzimática), uma vez que miotoxinas isoladas e descritas apresentam em sua estrutura a substituição do ácido aspártico D(49) por uma lisina K(49) característica genômica que leva a PLA₂ a perder sua atividade enzimática sem a perda de suas atividades farmacológicas (Homsí-Brandeburgo et al., 1988; Francis et al., 1991; Toyama et al., 1995; Gutiérrez e Lomonte, 1995 e Nakai et al., 1995). As PLA₂, tanto D49 como K49 podem estar ou não na forma agregada, mais comumente na forma dimérica (Arni e Ward, 1996).

A atividade catalítica também é dependente da presença de regiões moleculares conservadas, como a região do N-terminal, que é parte do canal hidrofóbico onde os lipídeos

entrariam para serem digeridos; modificações de alguns resíduos desta região parecem estar associadas também com a perda de atividades biológicas, como a agregação plaquetária (Arni e Ward, 1996). Além desta, outra região, a C-terminal, parece estar associada a eventos de citotoxicidade. Não se sabe com certeza se a catálise também é importante para a expressão da atividade das PLA₂, desta forma o estudo dessas regiões conservadas e dos resíduos que as constituem podem auxiliar em tal entendimento.

Assim, o isolamento e a caracterização de PLA₂ cataliticamente ativas ou não, são fundamentais para que estas possam ser utilizadas como ferramentas moleculares e modelos para ilustrar aspectos importantes, que possam ajudar a distinguir mais claramente os eventos farmacológicos dos catalíticos.

1.5 Neurotoxinas PLA₂

Neurotoxinas são componentes presentes nos venenos e peçonhas de espécies que normalmente afetam o sistema nervoso de diferentes maneiras: bloqueando os impulsos nervosos, de forma que a presa fique paralisada e a respiração interrompida, ou superestimulando o sistema nervoso, levando-o ao colapso com convulsões e a contração de todos os músculos, seguidas de morte (Rodríguez-Acosta et al., 2003). Várias neurotoxinas atuam pré-sinápticamente como, por exemplo, a tetrodotoxina, β-bungarotoxina, toxina botulínica e a latrotoxina, ou pós-sinápticamente como a α-bungarotoxina e a d-tubocurarina. As neurotoxinas de veneno de serpentes que alteram a transmissão no terminal do motoneurônio tem sido de considerável importância clínica e de pesquisas durante as últimas três décadas. Sua estrutura e modo de ação têm sido estudados de forma muito extensa. Devido aos maiores avanços nas técnicas da química de proteínas, as neurotoxinas são continuamente isoladas do veneno de diversas espécies de serpentes (Tu, 1991).

Um dos principais alvos dos venenos ofídicos é o sistema nervoso somático, em particular a junção neuromuscular da musculatura estriada esquelética, devido ao fato de não atravessarem a barreira hematoencefálica. A inibição da neurotransmissão neste sítio resulta na paralisia dos músculos ocular e bulbar, assim como paralisia dos músculos respiratórios, principalmente o diafragma, o que pode resultar em óbito. Desta maneira, muitas pesquisas são direcionadas a aumentar nossa compreensão sobre os mecanismos de ação dos venenos ofídicos e toxinas isoladas, na junção neuromuscular (Hodgson e Wickramaratna, 2002).

No entanto, nem todas as neurotoxinas tem o mesmo sítio, modo de ação ou produzem efeitos clínicos similares (Rodriguez-Acosta, 2001). Em relação aos componentes neurotóxicos dos venenos de serpentes, sendo mais bem descritos os da subfamília Crotalinae, sabe-se que muitos deles, em condições naturais não são capazes de penetrar a barreira hematoencefálica, mas em condições de profundas alterações ou apresentando soluções de continuidade, podem alcançar o sistema nervoso central (SNC) e originar quadros patológicos até agora pouco descritos (Monterrey, 2001).

As serpentes desenvolveram através de diferentes mecanismos genéticos evolutivos, a capacidade de expressar potentes toxinas inibitórias da transmissão neuromuscular pré-sináptica (β -neurotoxinas) ou pós-sináptica (α -neurotoxinas) em sítios específicos. A neurotoxicidade pré-sináptica está associada muitas vezes às fosfolipases A_2 encontradas nos venenos das serpentes (Hodgson e Wickramaratna, 2002). As PLA_2 mostram um alto grau de similaridade na sequência de aminoácidos, o que indica uma alta conservação na posição de pontes dissulfeto e da estrutura tridimensional. A função primária destas PLA_2 é digestiva. No entanto, um pequeno grupo de PLA_2 provenientes de veneno de serpentes, as β -neurotoxinas, tem evoluído como neurotoxinas mais potentes do que as α -neurotoxinas no bloqueio da transmissão neuromuscular, principalmente pela modificação na liberação do neurotransmissor acetilcolina (Tu, 1991).

Estas neurotoxinas pré-sinápticas que apresentam atividade fosfolipásica A_2 , têm sido identificadas nos venenos das três maiores famílias de serpentes venenosas (Elapidae, Hydrophiidae e Viperidae). Um número considerável de trabalhos tem sido direcionado à identificação do(s) sítio(s) de ligação no terminal nervoso pré-sináptico para estas toxinas, apesar destes mecanismos permanecerem não esclarecidos (Hodgson e Wickramaratna, 2002).

Duas classes de β -neurotoxinas provenientes de venenos de serpentes têm sido reconhecidas, as β -neurotoxinas caracterizadas pela presença da atividade catalítica PLA_2 e encontradas nos venenos de serpentes das famílias Elapidae e Viperidae e as β -neurotoxinas facilitatórias, incluindo a dendrotoxina, que bloqueia o canal de potássio voltagem-dependente, e a toxina anticolinesterásica, a fasciculina. As toxinas do segundo grupo são próprias de veneno de *Dendroaspis* sp. A ação neurotóxica caracterizada pelo bloqueio neuromuscular não altera significativamente a sensibilidade da placa motora ou sarcolema para a acetilcolina ou o KCl, respectivamente, ou seja, quando uma neurotoxina pré-sináptica age, não há, necessariamente, destruição da fibra muscular.

As neurotoxinas pós-sinápticas apresentam baixo peso molecular (7 a 8 kDa) e são desprovidas de atividade enzimática (Karlsson, 1979). As α -neurotoxinas são antagonistas competitivas dos receptores nicotínicos da placa motora terminal, no músculo esquelético, ligando-se a estes receptores, bloqueando a transmissão neuromuscular e conduzindo a morte por paralisia flácida do diafragma (Karlsson, 1979). Também são chamadas de toxinas curaremiméticas, devido ao seu modo de ação semelhante à d-tubocurarina, sendo que sua ligação a estes receptores se faz de forma não covalente (Tu, 1991).

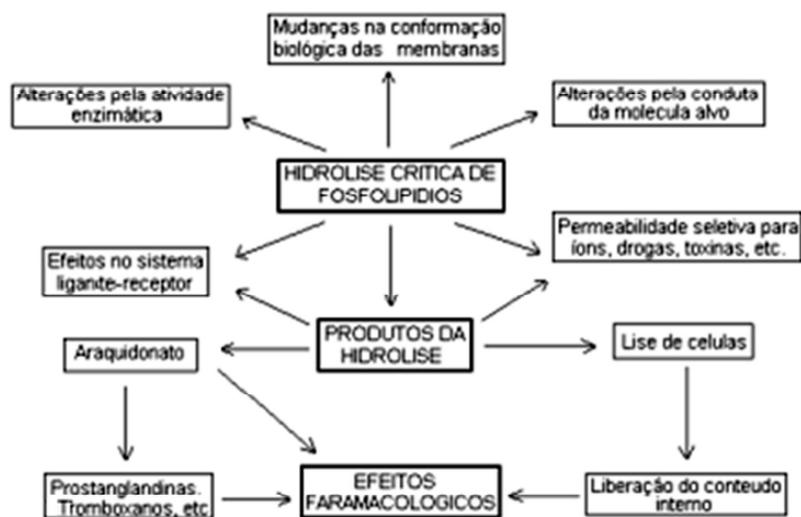
A maioria dos venenos contém múltiplas isoformas de uma neurotoxina que diferem em suas sequências de aminoácidos. Por enquanto não parece existir uma correlação direta entre cadeia estrutural e potência, mas tem sido postulado que há uma relação entre cadeia estrutural e ligação (Harris, 1991). Algumas das neurotoxinas pré-sinápticas têm sido bem caracterizadas, enquanto outras (paradoxina por exemplo) requerem mais investigações.

1.6 Função da atividade enzimática nos efeitos farmacológicos das PLA₂

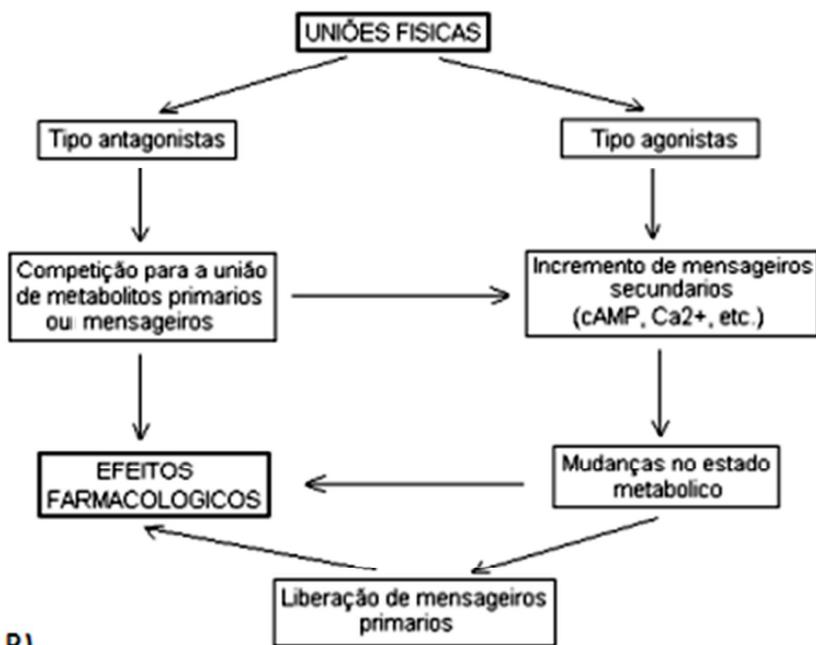
As enzimas PLA₂ provenientes de veneno podem induzir sintomas farmacológicos, os quais podem ser dependentes ou independentes da atividade hidrolítica sobre fosfolípeos. No caso das atividades farmacológicas dependentes da atividade catalítica, muito dos sintomas podem ser causados pela hidrólise total de fosfolípidios ou pela liberação de lisofosfolípeos e ácidos graxos.

A hidrólise total de fosfolípidios de membrana tem registrado alguns efeitos, tais como mudanças na conformação biológica das membranas (Lin-Shiau e Chen, 1982), alterações no comportamento da molécula alvo, devido a mudanças em seu micro ambiente, mudanças na permeabilidade seletiva a íons e drogas e também alterações na função do sistema receptor-ligante, o qual depende muito de fosfolípidios acoplados ao sistema (Rosemberg, 1986).

Estes são provavelmente os efeitos mais importantes, pelos quais as enzimas PLA₂ induzem efeitos farmacológicos em adição àqueles anteriormente citados (figura 6A e B).



A)



B)

Figura 6. Modos e mecanismos de ação de enzimas fosfolipases A_2 , sendo: A) Mecanismos dependentes da atividade catalítica e B) Mecanismos independentes da atividade catalítica (Adaptado de Kini e Evans, 1989a).

Os mecanismos de indução dos efeitos farmacológicos dependentes da ação enzimática são detalhados no esquema da figura 6A. Ao contrário, os efeitos farmacológicos podem ser induzidos pela união física da enzima PLA₂ à molécula alvo, sendo independentes da atividade catalítica. A união física pode interferir de alguma forma (figura 6B), impedindo a união de metabólitos aos segundos mensageiros. As PLA₂ podem também evidenciar estes efeitos pela ação de agonistas. A união das PLA₂ a receptores específicos podem ser fundamentais no estímulo de dois dos mensageiros e contribuir com a alteração do status metabólico das células-alvo. Nesta alteração do status metabólico das células-alvo, pode haver liberação de mensageiros primários, que proporcionam os efeitos farmacológicos observados.

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

As diferenças na potência farmacológica estão provavelmente relacionadas com a eficiência enzimática e a preferência por substrato da toxina. No caso dos efeitos farmacológicos independentes da atividade catalítica, existe uma absoluta afinidade com os receptores do tecido, sendo este um fator primário que determina a potência farmacológica. No entanto, a hidrólise de fosfolipídios pode agravar os efeitos farmacológicos (Kini e Evans, 1989 a, b e c).

1.7 *Bothrops roedingeri*

Bothrops roedingeri (Mertens, 1942), mostrada na figura 7A, conhecida como “jérgon da costa”, é uma serpente peçonhenta pertencente à família Viperidae, subfamília Crotalinae e encontra-se distribuída (figura 7B) principalmente na região litorânea do Peru (Campbell e Lamar, 2004).

Embora *B. roedingeri* seja uma espécie agressiva e perigosa, a sua peçonha é pouco estudada, quando comparada à peçonha de outras espécies tais como *B. jararaca*, *B. jaracussu*, *B. alternatus*, etc., amplamente estudadas pela importância clínica que têm nos acidentes ofídicos.

Em relação à *B. roedingeri* até agora só existem alguns relatos de isolamentos prévios e caracterizações parciais de frações com atividades miotóxica (Pantigoso et al., 2001,2002), proteásica (Azañero et al., 2000), fosfolipásica A₂, trombina-like, hemorrágica (Isla e Yarleque, 2003) hialuronidásica e fosfodiesterásica (Lerma et al., 2004).

Os efeitos locais observados no envenenamento por *B. roedingeri*, segundo os casos clínicos são: dor intensa na zona afetada, formação de edema, redução da pressão arterial, coagulação intravascular disseminada, hemólise, e finalmente necrose. Até agora não há estudos a respeito de um fator, ou fatores neurotóxicos, presentes na peçonha de *B. roedingeri*, provavelmente pela ausência de sintomas neurotóxicos característicos do envenenamento causado por serpentes dos gêneros *Micrurus* e *Crotalus* (corais e cascavéis).

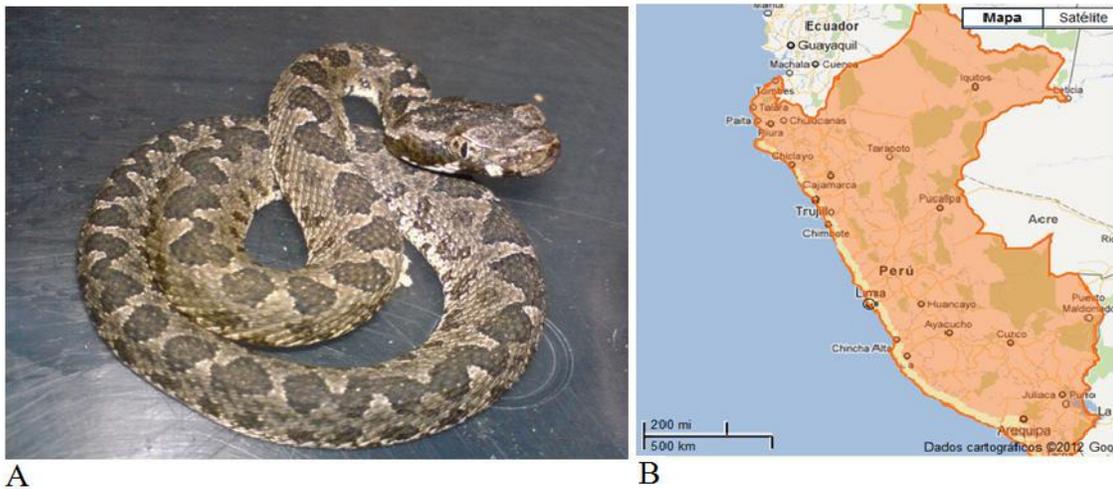


Figura 7. Em **A**, exemplar da serpente Viperidae peruana, *B. roedingeri*. Em **B** ná área mais clara, distribuição geográfica da serpente no Perú. (Adaptado de reptile-database).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Caracterizar físico-quimicamente e estudar os efeitos biológicos da PLA₂ BrTX-I isolada do veneno de *B. roedingeri* na neurotoxicidade, miotoxicidade e na inflamação.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Obter a PLA₂ BrTX-I do veneno de *Bothrops roedingeri* por isolamento através de cromatografia convencional e HPLC de fase reversa, e caracterização físico-química através de eletroforese SDS-PAGE, espectrometria de massas ESI-MS. Determinar a composição de aminoácidos, estudar a homologia estrutural e analisar comparativamente as propriedades enzimáticas e farmacológicas.

2.2.2 Avaliar *ex vivo* a atividade neurotóxica do veneno e da PLA₂ BrTX-I, na preparação biventer cervicis de pintainho (BCp).

2.2.3 Avaliar *in vivo* as propriedades miotóxicas local e sistêmica, através da dosagem dos níveis plasmáticos de CK e da atividade inflamatória, por medida do edema de pata e dosagem sérica de IL-1, IL-6 e TNF- α .

3. MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1 Veneno e reagentes

O veneno de *B. roedingeri* foi doado pela Profa. Dra. Corina Vera Gonzales, da Universidade Nacional de San Agustín, Arequipa, Peru.

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

3.2 Animais.

Os pintainhos (*Gallus domesticus*) machos HY-LINE W36 (4-10 dias de vida) foram gentilmente cedidos pela Granja Globo Aves Agropecuária Ltda. Os camundongos (*Mus musculus*) Swiss adultos (18-22 g) foram fornecidos pelo CEMIB/UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas de água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura e iluminação controlados. Os experimentos com animais foram feitos como indicam as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP de acordo com o protocolo N° 2006-1.(Anexo página 89)

3.3 Purificação das toxinas do veneno de *Bothrops roedingeri*

3.3.1 Isolamento da fração II do veneno de *Bothrops roedingeri* por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75.

Cinquenta miligramas do veneno total foram homogeneizados em 1 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC 1 M, pH 8,0). Esta solução de veneno foi então centrifugada a 9000 rpm por 3 minutos, para clarificação. O sobrenadante obtido foi então aplicado à coluna de exclusão molecular contendo a resina Sephadex G-75, previamente equilibrada com AMBIC 0,2 M pH 8,0. A amostra foi eluída com AMBIC 0,2 M a um fluxo constante de 0,25 mL/minuto e monitorado a 280 nm. As frações foram coletadas, liofilizadas e armazenadas a -20 °C.

3.3.2 Purificação da PLA₂ procedente do veneno de *Bothrops roedingeri* em HPLC de fase reversa.

Cinco miligramas da fração II da peçonha de *Bothrops roedingeri* obtida pela cromatografia de exclusão molecular, biomonitorada para atividades fosfolipásica e neurotóxica, foram dissolvidas em 200 µL de tampão A (ácido trifluoroacético 0,1%, pH 3,5), e aplicadas em

um sistema de 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 μ L e uma coluna μ -Bondapak C-18 (0,78 X 30 cm), previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%, pH 3,5. A eluição das amostras foi realizada usando gradiente linear com acetonitrila 66%. A corrida cromatográfica foi monitorada a 280 nm.

3.3.3 Repurificação da PLA₂ procedente do veneno de *Bothrops roedingeri* em HPLC de fase reversa.

Para confirmação do grau de pureza, o pico II-4 (BrTX-I), biomonitorado para atividades fosfolipásica e neurotóxica, foi repurificado em uma coluna μ -Bondapack C 18 (0.78 cm x 30 cm; Waters 991-PDA system) em HPLC de fase reversa.

3.3.4 Dosagem proteica pelo Método de Bradford.

A dosagem da concentração de proteínas presentes no veneno total, frações da Sephadex G-75 e da toxina PLA₂ isolada, foi realizada através do método de Azul de Coomassie G-250, o qual existe 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, possuindo 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 *B. roedingeri*. A análise das amostras foi feita no comprimento de onda de 595 nm em leitor de ELISA, (VERSAmix microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) (Bradford, 1976).

3.4 Eletroforese em SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por Laemmli (1970) em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments). As placas de poliacrilamida foram feitas de modo descontínuo apresentando um gel de concentração de 5 % e um gel de corrida de 12,5 % a partir de uma solução de acrilamida estoque. O gel de concentração foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e o gel de corrida foi feito utilizando-se o tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 8,8. Em ambos os géis foram acrescentados 0,1 % (v/v) de SDS 20 %.

As amostras (veneno total, fração II, BrTX-I e BrTX-I reduzida) e os marcadores de massa molecular foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl 0,075 M, pH 6,8; 10 % de glicerol; 4 % de SDS; 0,001% de bromofenol). A corrida eletroforética foi realizada a 30 mA. Os géis foram corados com solução de Coomassie Blue 0,05 % a 37 °C, o excesso de corante foi removido em ácido acético 7 %.

3.5 Análise de aminoácidos

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

3.6 Determinação da massa molecular da BrTX-I por espectrometria de massas Electrospray (ESI-MS).

Uma alíquota de cada proteína (4,5 µL) foi injetada em uma coluna C18 UPLC de fase reversa (nanoAcquity UPLC, Waters) acoplada com um sistema de espectrometria de massas em tandem nano-electrospray em um espectrômetro de massa Q-Tof Ultima API (MicroMass/Waters) a um fluxo de 600 nL/min. O gradiente foi de 0-50% de acetonitrila em ácido fórmico 0,1 % durante 45 min. O instrumento foi operado em modo MS contínuo e a aquisição de dados foi de 100-3000 *m/z* a velocidade de 1s e um “delay” de 0,1 s. Os espectros foram acumulados cerca de 300 scans e os múltiplos dados carregados produzidos pelo espectrômetro de massa na escala *m/z* foram convertidos para escala de massa molecular usando o software Maxium Entropy fornecido com o pacote Masslynx 4.1. Os parâmetros de processamento foram: faixa de massa de saída 6000-20000 Da com resolução de 0,1 Da/canal; a proporção de intensidade mínima entre picos sucessivos foi 20 % (esquerdo e direito).

3.7 Determinação estrutural da PLA₂ BrTX-I.

3.7.1 Redução e alquilação.

A proteína liofilizada BrTX-I purificada em HPLC de fase reversa foi re-suspendida em ureia 8 M contendo DTT 10 mM a pH 8,0 e incubada a 37 °C por duas horas para redução das

pontes dissulfeto. Iodoacetamida foi utilizada para alquilar o grupo tiol livre a partir dos resíduos de cisteína reduzidos. Apoiados em experimentos prévios foi escolhido um excesso molar em 30 % de iodoacetamida em relação ao número total de tióis. A mistura foi incubada por 1,5 horas a 37 °C em escuridão. A reação foi parada injetando a mistura em uma coluna de HPLC de fase reversa seguida de liofilização dos picos coletados.

3.7.2 Hidrólise enzimática

A proteína purificada BrTX-I foi hidrolisada com tripsina pancreática bovina com grau de pureza para sequenciamento em bicarbonato de amônio 0,4 % pH 8,5 durante 4 horas a 37 °C em uma proporção enzima: substrato de 1:100 (v/v). A reação foi parada por liofilização.

3.7.3 Espectrometria de massas em tandem

Espectrometria de massa em tandem ESI-MS foi realizada usando um espectrômetro de massas híbrido quadrupole-time of flight (Q-TOF, Micromass Manchester, UK), equipado com uma fonte de nano spray operando em modo de ionização positivo. As condições de ionização foram: voltagem capilar de 2,3 kV, um cone voltagem e lentes RF1 de 30 e 100 V, respectivamente, e uma energia de colisão de 10eV. A temperatura da fonte foi 70 °C e o cone do gás foi N₂ a um fluxo de 80 L/h; não foi utilizado gás nebulizador para obter o spray. Gás argônio foi utilizado para fragmentação de íons. Foi realizada calibração externa com iodeto sódico em uma faixa de massas a partir de 50 até 3000 m/z. Todos os espectros foram adquiridos com o analisador TOF em modo “Vmode” (TOF kV = 9,1) e voltagem MCP a 2150 V.

3.7.4 Sequenciamento “de novo” dos peptídeos trípticos

Peptídeos trípticos alquilados a partir da PLA₂ BrTX-I foram separados em HPLC de fase reversa, coletados manualmente, liofilizados e re-suspendidos em 20 % de acetonitrila e 0,1 % de TFA.

Cada peptídeo foi introduzido por separado na fonte do espectrômetro de massa com uma seringa a um fluxo de 500 nL/min⁻¹. Antes de realizar os espectros de massa em tandem foi adquirido um espectro ESI-MS (modo TOF MS) para cada pico obtido do HPLC de fase reversa na faixa de 400–2000 m/z para selecionar os íons de interesse. Posteriormente esses íons foram fragmentados em uma célula de colisão (modo TOF MS/MS). Diferentes energias de colisão foram utilizadas dependendo do estado de carga e massa dos íons. Os espectros resultantes foram

adquiridos no analisador TOF e resolvidos usando o software MassLynx-MaxEnt 3 algorithm. Espectros com uma carga só foram processados manualmente usando o aplicativo PepSeq incluído no MassLynx.

3.8 Cinética enzimática

3.8.1 Atividade Fosfolipásica A₂

A determinação da atividade PLA₂ foi realizada segundo o método descrito por Cho e Kézdy (1991) e Holzer e Mackessy (1996) e adaptado para microplaca (Ponce-Soto et al., 2007a).

A mistura para o ensaio contém 200 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM e NaCl 100 mM pH 8), 20 µL do substrato cromogênico ácido 4-nitro-(3-octanoiloxi) benzóico (4N3OBA), 20 µL de água e 20 µL de PLA₂ (teste) ou 20 µL de água (controle), em um volume final de 260 µL. Após a adição de 20 µL da PLA₂ em teste, a mistura foi incubada por 40 minutos a 37 °C e a absorbância foi lida a intervalos de 10 minutos. A atividade enzimática, expressa como a velocidade inicial da reação (*V*₀) foi calculada baseada no aumento da absorbância após 20 minutos. O ensaio foi realizado em triplicata, monitorando a formação do produto ácido 4-nitro-(3 hidroxil) benzóico (cromóforo), lendo-se a absorbância a 425 nm em um VERSAmax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Uma unidade enzimática (UE) é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 nmol de produto por minuto.

3.8.2 Efeito do pH na atividade PLA₂

Os ensaios do efeito do pH sobre a atividade PLA₂ foram realizados em meios de reação preparados com diferentes valores de pH (4-10). Para cada valor de pH foi feito um controle e a determinação da atividade PLA₂ foi feita conforme o item 3.8.1 Os tampões utilizados nos experimentos foram: tampão Citrato de sódio pH 4, 5 e 6, tampão Tris-HCl pH 7 e 8, tampão Glicina pH 9 e 10.

3.8.3 Efeito da temperatura na atividade PLA₂

Para determinação da temperatura ótima, foi avaliada a atividade PLA₂ em meios de reação a 25, 30, 35, 40 e 45 °C. A atividade enzimática foi determinada conforme o método descrito por Cho e Kézdy (1991) e Holzer e Mackessy (1996) e adaptado para microplaca (Ponce-Soto et al., 2007a).

3.8.4 Efeito da concentração do substrato na atividade PLA₂

Este ensaio foi feito variando-se a concentração do substrato cromogênico 4N3OBA. As concentrações utilizadas foram: 40; 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,2 e 0,1 mM. A metodologia utilizada foi a mesma descrita por Cho e Kézdy (1991) e Holzer e Mackessy (1996) e adaptado para microplaca (Ponce Soto et al., 2007a).

3.8.5 Efeito de íons divalentes na atividade PLA₂

A atividade da PLA₂ foi estudada na presença dos íons divalentes: Ca⁺², Mg⁺², Mn⁺², Cd⁺² e Zn⁺². Para a preparação dos tampões, foram usados sais dos respectivos metais e a determinação da atividade PLA₂ foi feita conforme o método descrito por Cho e Kézdy (1991) e Holzer e Mackessy (1996) e adaptado para microplaca (Ponce-Soto et al., 2007a).

3.8.6 Inibição da atividade enzimática da BrTX-I pela crotapotina.

A crotapotina é uma molécula que se complexa com uma PLA₂ crotálica formando a crotoxina, constituinte neurotóxico do veneno de serpentes do gênero *Crotalus*. A PLA₂ do complexo crotoxina tem seu sítio catalítico bloqueado pela crotapotina e sua atividade fosfolipásica reduzida ou abolida. A capacidade de inibição da atividade catalítica das PLA₂ botrópicas pela crotapotina, indica uma similaridade entre o sítio catalítico das PLA₂ dos diferentes gêneros. Amostras de BrTX-I (1 mg/mL) obtidas do veneno total como descritos anteriormente foram pré-incubados por 20 minutos no tampão de reação com a crotapotina obtida do veneno de *C. d. terrificus* na razão de 1:1 (W/W), o meio de pré-incubação foi o mesmo do ensaio enzimático sem a enzima ou crotapotina. Após este tempo de incubação, o substrato cromogênico 4-nitro-3-octanoyloxi-ácido benzóico (4N3OBA) foi colocado no meio de reação, e após 20 minutos a 37 °C, os ensaios foram lidos a 425 nm no mesmo aparelho VERSAmax microplate reader, como descrito acima.

3.9 Determinação das atividades biológicas

3.9.1 Medida da atividade neurotóxica em músculo biventer cervicis de pintainho

A preparação *ex vivo* neuromuscular biventer cervicis foi utilizada devido à sua sensibilidade à adição de ACh e KCl exógenos, respondendo com contratura na ausência de estimulação elétrica, possibilitando desta forma diferenciar-se um bloqueio pré de um pós-

sináptico. A técnica utilizada foi a descrita por Ginsborg e Warriner (1960). Os animais foram eutanasiados com dose letal de isoflurano. Os músculos biventer cervicis foram removidos e montados cada um sob uma tensão de 0,5 g em cubas de 5 mL (Automatic organ multiple-bath LE01 Letica Scientific Instruments. Barcelona, Spain) a 37 °C, contendo solução Krebs (pH 7,5) aerada (95 % O₂ – 5 % CO₂) com a seguinte composição (em mM): NaCl 118,7; KCl 4,7; CaCl₂ 1,88; KH₂PO₄ 1,17; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 25,0 e glicose 11,65.

Um eletrodo bipolar de platina foi colocado na região de transição entre o tendão e o músculo de modo a produzir uma estimulação de campo. A estimulação indireta foi realizada com um Estimulador (MAIN BOX LE 12404 Panlab s.l. Powerlab AD Instruments Barcelona, Spain) sob as seguintes condições: 0,1 Hz; 0,2 ms e 5 V.

Contrações musculares e contraturas foram registradas isometricamente por transdutores de força (Modelo MLT0201 Force transducer 5 mg-25 g Panlab s.l. AD Instruments Pty Ltd. Spain) conectados a um PowerLab/4SP (OUAD Bridge AD Instruments, Barcelona, Spain) (Ponce-Soto, *et al.*, 2007).

3.9.2 Determinação dos níveis de CK plasmáticos em camundongos inoculados pelas vias intramuscular (miotoxicidade local) e intravenosa (miotoxicidade sistêmica)

Foram avaliadas as diferenças encontradas nos níveis de CK plasmáticos em camundongos de 18 a 20 g de peso, injetados com as toxinas pelas vias intramuscular e intravenosa. Foi utilizado um n de 5 animais para cada experimento. A dose da toxina injetada foi de 20 µg em 50 µL de PBS tanto pela via intramuscular (gastrocnêmio) quanto intravenosa (veia caudal). Foram dosados os níveis de CK plasmáticos depois de 0,5; 1; 3; 6; 12 e 24 horas. O kit utilizado foi o CK–Nac (Creatine Kinase Bicon Diagnostick Germany). A cada 1 mL do substrato preparado foram acrescentados 10 µL do plasma obtido por centrifugação do sangue retirado da região caudal do camundongo. Incubou-se por 2 minutos e a leitura realizada a 430 nm. Posteriormente multiplicou-se o incremento da absorbância pelo fator 4130 (Creatine Kinase Bicon Diagnostick Germany) para a determinação da concentração plasmática de CK (U/L).

3.9.3 Determinação da atividade edematogênica

Como parte dos estudos da atividade inflamatória analisou-se um dos eventos que ocorre neste processo, a formação de edema. A capacidade da BrTX-I em induzir edema foi estudada em grupos de 5 camundongos Swiss (18-20 g). A PLA₂ BrTX-I foi diluída em 20 µL de PBS

(phosphate-buffered saline: 0,12 M NaCl, 0,04 M fosfato de sódio, pH 7,2) e administrada nas doses de 1, 5, 10 e 20 µg/pata, na região intraplantar da pata posterior direita. O grupo controle recebeu um volume equivalente de PBS na região intraplantar da pata posterior direita. O edema da pata foi medido com paquímetro logo após a administração e 0,5; 2; 3; 6 e 24 horas após a administração. O edema foi expresso como o percentual de aumento, medido em milímetros com paquímetro, no volume da pata dos animais tratados em relação ao volume da pata dos animais do grupo controle, a cada intervalo de tempo.

3.9.4 Dosagem das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α .

As concentrações plasmáticas de IL-1, IL-6 e TNF- α foram determinadas 0,5; 1; 3; 6 e 12 horas após a administração nos camundongos, pela via intramuscular, da PLA₂ BrTX-I (20 µg/100 µL) na dose de 1,0 mg/kg, ou de solução salina estéril (NaCl a 0,9 %). Após a centrifugação das amostras do sangue coletado da veia caudal, os sobrenadantes foram utilizados para a determinação dos níveis de IL-1, IL-6 e TNF- α por um imunoenensaio enzimático específico. Os níveis de citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α no plasma dos camundongos BALB/c foram determinados pelo método ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Placas específicas para o teste de ELISA (96 poços) foram recobertas com 100 µL/poço (1 µg/mL) de anticorpos monoclonais para IL-1, IL-6 e TNF- α em tampão carbonato de sódio 0,1 M (pH 8,2) e incubado por 6 horas em temperatura ambiente. Os poços foram então lavados com uma solução salina-tampão fosfato 0,1 % (PBS/Tween-20) e anticorpos monoclonais foram fixados à placa com 100 µL de soro fetal bovino incubado com PBS por 2 horas em temperatura ambiente. Após lavagem, amostras do plasma (50 µL) em duplicata foram adicionadas a cada poço. Após 18 horas de incubação a 4 °C, os poços foram lavados e incubados com 100 µL (2 µg/mL) de anti-anticorpos para TNF- α , IL-1 e IL-6 por 45 minutos à temperatura ambiente. Após uma lavagem final, a reação de quantificação foi realizada pela adição de ortofenildiamina (OPD) a cada poço. As densidades ópticas foram medidas a 405 nm em um leitor de microplacas VERSAmax 190 multiwell plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

O conteúdo de citocinas de cada amostra foi determinado a partir da curva-padrão estabelecida com as citocinas recombinantes apropriadas (expressas em picogramas por mililitro).

3.10 Análise Estatística

Os resultados foram representados pela média de experimentos \pm desvio padrão. A significância foi obtida através do teste não pareado t-Student e considerado como $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Purificação da PLA₂ D49 proveniente do veneno de *Bothrops roedingeri*.

4.1.1 Isolamento da fração II a partir de veneno total de *Bothrops roedingeri* em coluna de Cromatografia de Exclusão Molecular Sephadex G-75

O perfil cromatográfico do veneno total de *Bothrops roedingeri* mostrou a presença de 4 frações denominadas como I, II, III e IV conforme a figura 8. As atividades PLA₂ e neurotóxica foram encontradas na fração II, fração esta que representa aproximadamente 30% do veneno seco total.

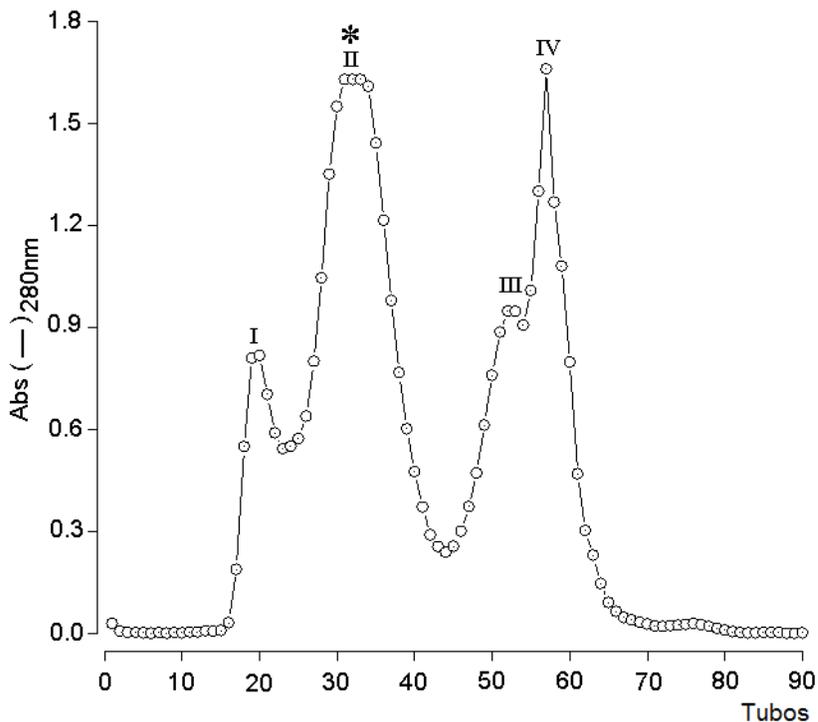


Figura 8. Cromatografia de Exclusão Molecular do veneno de *Bothrops roedingeri* em uma coluna de Sephadex G-75 (78 x 2cm). O veneno (50mg) foi aplicado à coluna pré-equilibrada com tampão bicarbonato de amônia 0,2M e pH 8,0, a um fluxo de 0,25 mL/min. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm. As principais frações obtidas, identificadas como I, II, III e IV foram reunidas em “pools” correspondentes, liofilizadas e armazenadas. (* Atividade PLA₂ e neurotóxica)

4.1.2 Purificação em HPLC de fase reversa, da PLA₂ presente na fração II isolada do veneno total de *Bothrops roedingeri* por exclusão molecular em Sephadex G-75

A fração II anteriormente obtida foi submetida a mais uma etapa de purificação em HPLC de fase reversa. A corrida foi realizada em uma coluna μ -Bondapack C18 (0.78 cm \times 30 cm; Waters 991-PDA system), acoplada a um sistema de RP-HPLC 991-PDA. O perfil cromatográfico, como mostra a figura 9, apresentou 10 frações majoritárias denominadas II-1 a II-10. Atividade PLA₂ e neurotóxica foram encontradas na fração, II-4 denominada, de agora em diante, como PLA₂ BrTX-I.

Para confirmação do grau de pureza, o pico II-4 (BrTX-I) foi repurificado em uma coluna μ -Bondapack C 18 (0.78 cm x 30 cm; Waters 991-PDA system) em HPLC de fase reversa e submetido à uma eletroforese SDS-PAGE, apresentando um alto nível de homogeneidade molecular (95%), pela presença de um único pico, BrTX-I, com uma diferença muito pequena no tempo de retenção de 37.19 ± 0.34 min (detalhe figura 9).

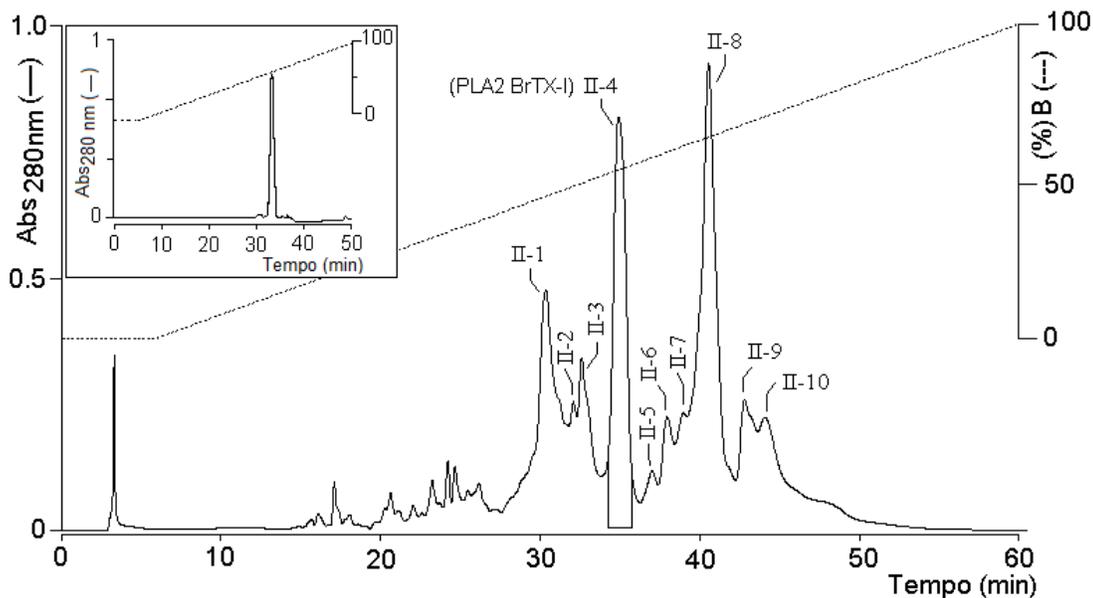


Figura 9. RP- HPLC da fração II da peçonha da serpente *B. roedingeri* em uma coluna μ -Bondapack C18 (0.78 cm \times 30 cm; Waters 991-PDA system). A fração II (5,0 mg) foi diluída em 200 μ L de tampão A (ácido trifluoroacético 0,1 %, pH 3,5) e aplicada à coluna e as proteínas foram eluídas usando gradiente linear com acetonitrila 66 %. A corrida cromatográfica foi monitorada a 280 nm, O pico que apresentou maior atividade fosfolipásica (II-4) foi demarcado (Δ) e está indicado como PLA₂ BrTX-I. No detalhe, perfil da re-cromatografia da BrTX-I em HPLC de Fase Reversa.

4.1.3 Tabela de purificação da BrTX-I

O veneno total de *B. roedingeri* foi fracionado em 4 picos após ter passado por uma resina Sephadex G-75 (exclusão molecular). A atividade fosfolipásica estava presente somente no segundo pico (fração BrII). No segundo passo cromatográfico em HPLC de fase reversa utilizando uma coluna C-18, a fração II foi resolvida em 10 picos principais, sendo a atividade fosfolipásica A₂ detectada no quarto pico (BrII-4) . A metodologia usada nos permitiu a purificação, isolamento e concentração da PLA₂ (BrTX-I). A combinação destas duas etapas cromatográficas demonstrou-se apropriada, já que envolve diferentes mecanismos de separação para proteínas de interesse.

Após o primeiro passo, a PLA₂ D49 (BrTX-I) foi purificada 1,96 vezes, necessária para obter a enzima num estado homogêneo e no segundo passo foi purificada 71,53 vezes, com rendimento de 22,5 % em relação ao veneno total.

A tabela 2 exhibe 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 PLA₂.

Tabela 2. Purificação e cálculo de atividade específica da fosfolipase A₂ BrTX-I, isolada do veneno de *Bothrops roedingeri*. UE/mL= nmol/min/mL

Etapa de Purificação	Proteína (mg/mL)	Atividade (UE/mL)	Atividade Total (U.T.)	Atividade Específica (U/mg)	Rend. (%)	Purif. (vezes)
Veneno Total	0,54	245	2940	5444	100	1,00
Sephadex G-75 (BrII)	0,073	130	780	10685	26,5	1,96
HPLC-FR (BrTX-I)	0,0017	662	662	389412	22,5	71,53

4.1.4 Eletroforese em SDS-PAGE da PLA₂ BrTX-I

A figura 10 mostra a eletroforese em gel de poliacrilamida do veneno total de *B. roedingeri* e das frações correspondentes aos passos cromatográficos de exclusão molecular G-75 e HPLC fase reversa. Os marcadores moleculares utilizados foram de: Isozima 14 kDa, inibidor de tripsina da soja 20 kDa, Anidrase Carbônica 30kDa, Ovoalbumina 43 kDa, Albumina 66 kDa, Fosforilase b 97 kDa. O veneno total (VT) apresentou várias bandas, evidenciando a complexa mistura proteica que possui. A fração Br-II obtida da cromatografia de exclusão molecular apresentou bandas proteicas em torno de 14 a 37 kDa aproximadamente. A fração BrII-4 (BrTX-I) tanto em condições não reduzidas como em condições reduzidas (BrII-4*), apresentou uma única banda proteica (massa molecular relativa de aproximadamente 14 kDa), de mobilidade eletroforética restrita, o que denota homogeneidade molecular.

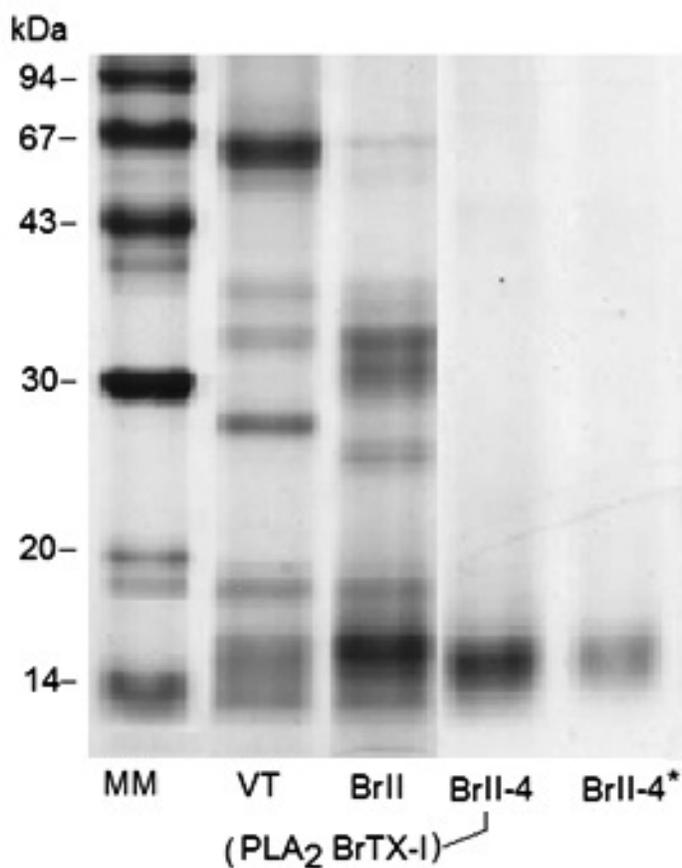


Figura 10. Perfis eletroforéticos em SDS-PAGE (12,5%) do veneno total de *B. roedingeri*, da fração BrII obtida por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75, da fração BrII-4 e BrII-4* (fração reduzida).

4.1.5 Medida da atividade PLA₂ do veneno total, fração BrII e BrII-4 (BrTX-I) do veneno de *Bothrops roedingeri*.

A medida da atividade PLA₂ foi realizada segundo Cho e Kézdy (1991), Holzer e Mackessey (1996) e adaptado para micro-placa por Ponce-Soto et al. (2006) usando o 4-nitro-3-(octanoyloxy) ácido benzóico como substrato cromogênico.

A atividade PLA₂ para o veneno total de *B. roedingeri* foi de $2,592 \pm 0,617$ nmol/mg/min (figura 11), a fração BrII, com atividade de $4,902 \pm 0,402$ nmol/mg/min e a PLA₂ BrTX-I (BrII-4) com atividade de $16,868 \pm 0,643$ nmol/mg/min.

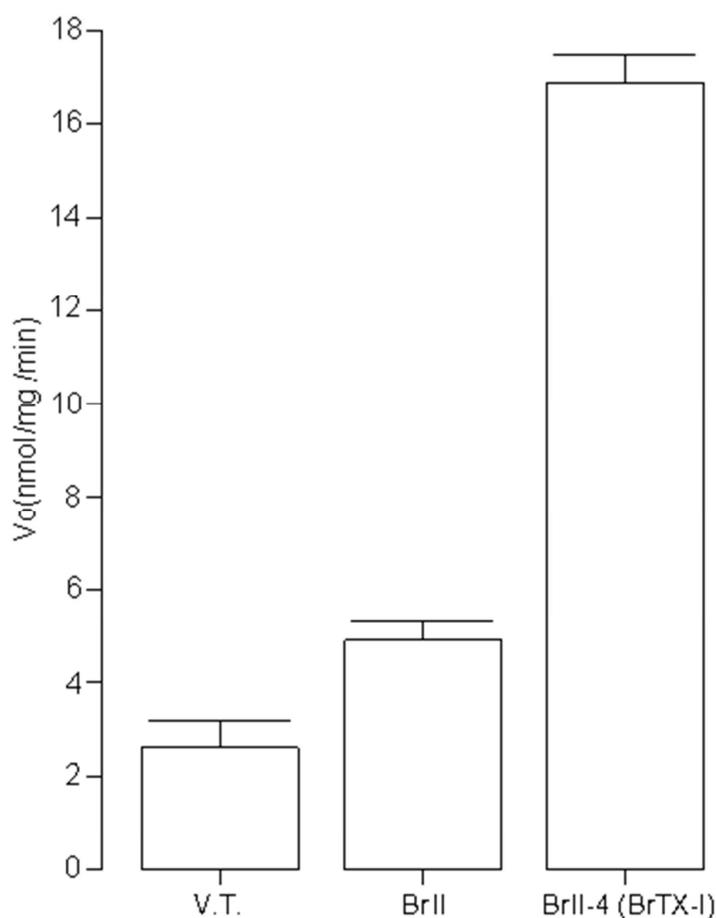


Figura 11. Atividade PLA₂ proveniente do veneno total de *B. roedingeri* (VT), das frações BrII e BrII-4 (PLA₂ BrTX-I), utilizando o ácido 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzóico como substrato cromogênico. Os experimentos foram realizados em triplicata, com o desvio padrão de cada ponto representado na curva ($p < 0,05$).

4.2 Estudos cinéticos da PLA₂ BrTX-I isolada de veneno total de *Bothrops roedingeri*.

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 influem nos processos biológicos.

O efeito da concentração do substrato na atividade PLA₂ da BrTX-I sobre o substrato 4-nitro-3-(octanoyloxy) ácido benzóico mostra que a PLA₂ apresenta cinética sigmoideal no gráfico velocidade/substrato, principalmente a baixas concentrações, indicando uma tendência alostérica (figura 12.A). Além disso, foram determinados os valores de K_m e V_{max} a partir do gráfico duplo recíproco de Lineaweaver-Burk da fração BrTX-I (Figura 12.B). Nestas condições o valor da constante K_m é 4,88 nmol e V_{max} 3,0 nmoles/mg/min. A figura 12.C mostra o efeito da variação do pH sobre a atividade enzimática da PLA₂ BrTX-I. A maior atividade PLA₂ para esta toxina ocorre em pH 8,0 sendo inativa em valores de pH maiores que 9 e menores do que 7. A temperatura ótima para a atividade da PLA₂ BrTX-I está próxima a 37 °C conforme ilustrado na figura 12.D, mas em torno dos 40-45 °C ainda manteve uma atividade enzimática moderada.

A atividade enzimática da PLA₂ BrTX-I foi verificada na presença de alguns cátions divalentes, tais como Mg⁺², Mn⁺², Cd⁺², Zn⁺² na concentração de 10 mM e também na ausência e presença de Ca⁺² nas concentrações de 1 e 10 mM. A figura 12.E mostra a influência dos íons divalentes na atividade PLA₂. BrTX-I exibe dependência de Ca⁺², porém precisa de baixas concentrações de Ca⁺² para ter uma atividade total. Não se observa uma diferença significativa de atividade enzimática entre as concentrações 1 e 10 mM de Ca⁺². A mudança completa de Ca⁺² 10 mM para Cd⁺², Zn⁺² ou Mn⁺² reduz a atividade para níveis similares aos observados em ausência de Ca⁺². Na presença de Ca⁺² em baixas concentrações (1 mM) a adição de Mn⁺² ou Mg⁺² (10 mM) mantêm ou inibe pouco a atividade enzimática, no entanto Cd⁺² ou Zn⁺² resultaram em inibição quase completa.

A inibição da atividade PLA₂ da BrTX-I, pela crotapotina de *C. d. terrificus* foi determinada incubando-se com a PLA₂ BrTX-I na razão molar de 1:1 por 30 minutos a 37 °C. A crotapotina foi capaz de inibir a atividade PLA₂ da BrTX-I em mais de 60% (figura 12.F), como ocorre com as PLA₂ crotálicas.

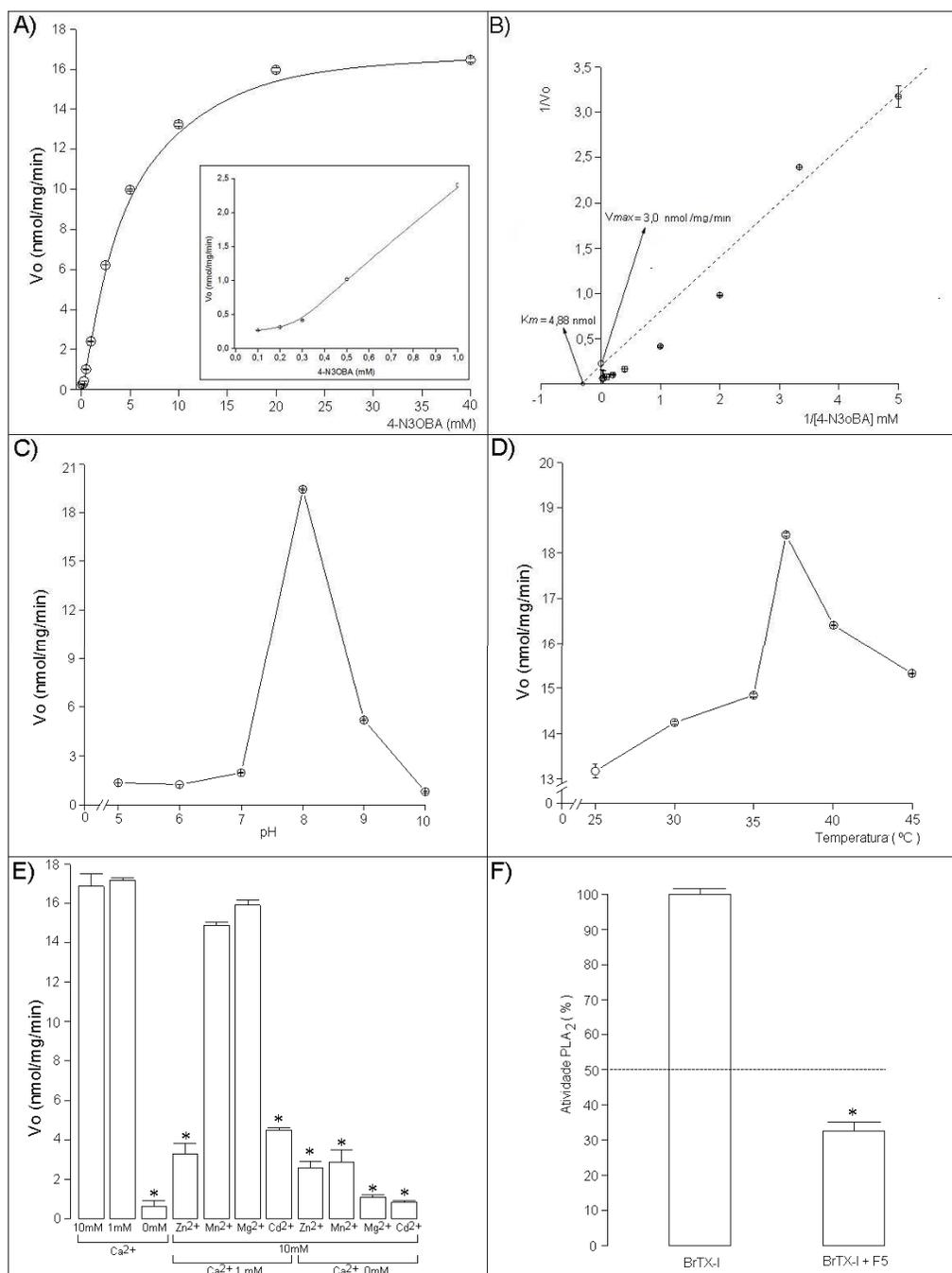


Figura 12. A. Efeito da concentração do substrato 4-nitro-3-(octanoyloxy) ácido benzóico na atividade PLA_2 de BrTX-I, isolada de veneno de *B. roedingeri*. Detalhe: cinética a baixa concentração de substrato. B. Gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk com valores de K_m e V_{max} da fração BrTX-I. C. Efeito do pH sobre a atividade enzimática da PLA_2 BrTX-I isolada de veneno de *B. roedingeri*. D. Efeito da temperatura na atividade enzimática da PLA_2 BrTX-I isolada de veneno de *B. roedingeri*. E. Efeito de diferentes íons sobre a atividade enzimática da BrTX-I, na presença e ausência de cálcio. F. Inibição da atividade enzimática da BrTX-I pela crotopotina (F5) de *C. d. terrificus*. Os experimentos foram realizados em triplicata, com o desvio padrão de cada ponto representado na curva (* $p < 0,05$).

4.3 Análise de composição de aminoácidos da PLA₂ BrTX-I isolada do veneno de *Bothrops roedingeri*

Com relação à análise global da composição de aminoácidos, a tabela 3 evidenciou alta presença de resíduos dos aminoácidos básicos Lys e Arg, além de Asp e Tyr. Mostra a presença de 14 resíduos de cisteína, o que sugere a formação de sete pontes dissulfeto, característica altamente preservada nas fosfolipases A₂ e o número de aminoácidos determinado (120) sugere que se trata de uma PLA₂, por compartilharem muitas das características físico-químicas deste grupo de proteínas. A massa molecular calculada foi de 13.783,42 Da.

Tabela 3. Composição de aminoácidos da PLA₂ BrTX-I isolada de veneno de *B. roedingeri*. Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteína. PM em Da. *) Não determinado (ND).

<i>Aminoácido</i>	Mol AA	PM
Asp	10	1151,1
Glu	7	9039,1
Ser	6	522,55
Gly	6	342,22
His	3	411,48
Arg	9	1405,89
Thr	6	666,72
Ala	5	355,45
Pro	7	679,91
Tyr	8	913,2
Val	5	815,75
Met	1	131,21
Cys	14	1443,96
Ile	5	515,85
Leu	7	792,19
Phe	3	441,57
Lys	18	2307,42
Trp *	ND	ND
Total	120	13783,42

4.4 Determinação da massa molecular por Espectrometria de Massas ESI-MS (TOF)

A análise da BrTX-I por espectrometria de massas ESI-MS (TOF) confirmou a homogeneidade da proteína e determinou a massa molecular exata de 14.358,69 Da. A figura 13 mostra o espectro da BrTX-I com os valores de massa (m/z) da proteína ionizada (MH^+).

A massa da proteína após ser reduzida e alquilada foi de 15170,35 Da (detalhe na figura 9). O incremento de massa de 812 Da indica a presença de 14 resíduos modificados de Cys-CAM.

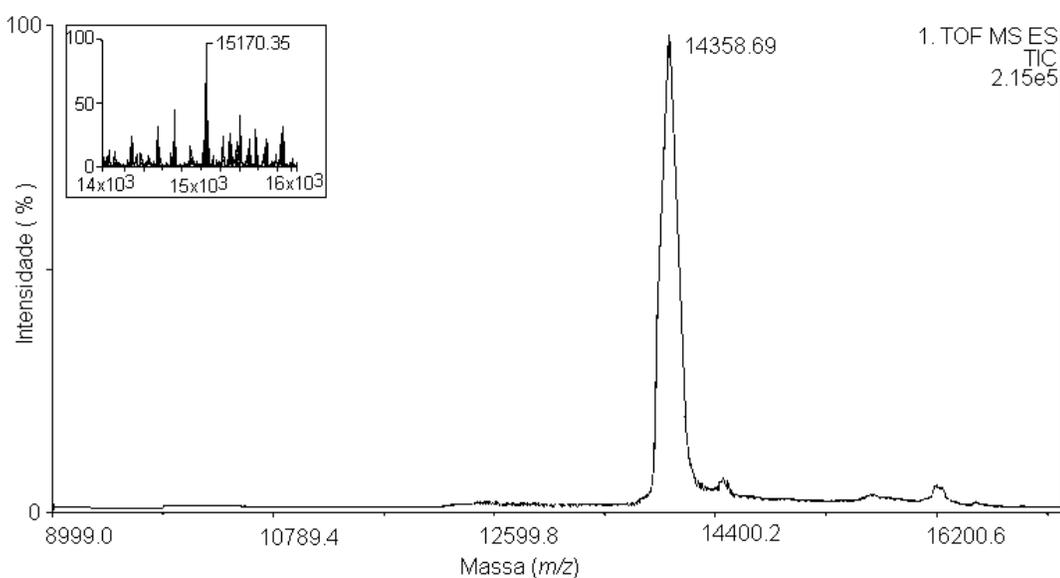


Figura 13. Determinação da massa molecular da PLA₂ BrTX-I nativa por espectrometria de massas ESI-MS (TOF). O íon molecular MH^+ é mostrado no espectro. Detalhe: espectro da massa da BrTX-I reduzida e alquilada evidenciando os múltiplos canais de alquilação.

4.5 Análise Estrutural da BrTX-I

A proteína alquilada foi digerida com tripsina bovina e os peptídeos trípticos resultantes foram separados em HPLC de fase reversa. Foram sequenciados 5 picos os quais foram identificados no perfil cromatográfico (dados não mostrados). Cada pico foi coletado manualmente e liofilizado. O sequenciamento “*de novo*” dos peptídeos foi feito por espectrometria de massas em tandem ESI-MS. Os dados obtidos foram processados usando o software Mascot MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com).

A tabela 4 mostra as massas medidas e a sequência deduzida de cada um dos peptídeos obtidos a partir da clivagem tríptica da PLA₂ BrTX-I alquilada.

Não foram discriminados os resíduos de lisina e isoleucina em nenhuma das sequências reportadas devido ao fato de serem indistinguíveis no espectro CID (dissociação induzida por colisão) de baixa energia. Devido à calibração externa aplicada a todos os espectros não foi possível resolver a diferença de 0,036 Da entre resíduos de glutamina e lisina, exceto para as lisinas que foram deduzidas em base à clivagem da tripsina (tripsina cliva no extremo carboxi terminal de lisina ou arginina). Cada peptídeo sequenciado “*de novo*” foi submetido à base de dados NCBI usando o programa BLAST-p protein search com uma procura restrita a proteínas básicas com atividade fosfolipase A₂.

Tabela 4. Massas moleculares e sequências de aminoácidos obtidas por espectrometria de massas ESI-MS/MS dos peptídeos trípticos da BrTX-I alquilados. Os peptídeos foram separados por HPLC de fase reversa. C = cisteína alquilada. Os resíduos de lisina mostrados em negrito foram deduzidos da clivagem pela tripsina. Todas as massas moleculares são reportadas como monoisotópicas.

BrTX-I HPLC Fração	Massa Medida (Da)	Sequência de Aminoácidos	Massa Teórica (Da)
1	1360.65	DL/IWQ/KWNK/QMI/LK/Q	1360.61
2	1404.67	DI/LTI/LVCGEDL/IPCK/Q	1404.64
3	1791.07	AAAVCFYENL/IGTYNK/QK/Q	1791.03
4	1120.28	YGCYCGWGGR	1020.25
5	616.79	L/ITGCPK/Q	616.75

O espectro de massa em tandem mostrado na figura 14, pertence ao peptídeo tríptico número quatro, o qual tem a sequência Y G C Y C G W G G R, contendo um domínio da alça de ligação ao cálcio, característico das PLA₂.

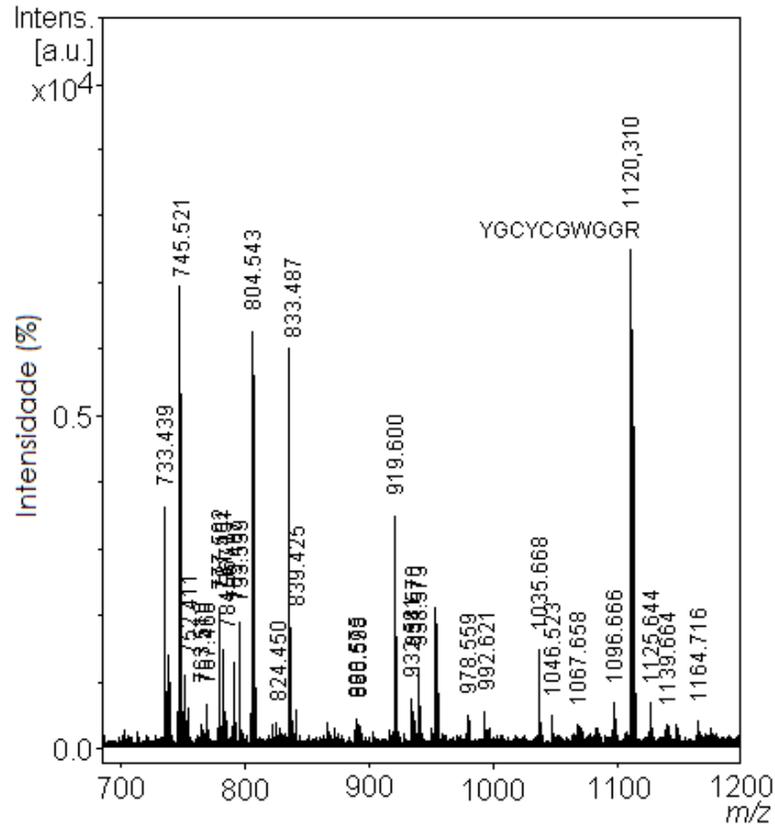


Figura 14. Espectro MS/MS do íon do peptídeo tríptico de m/z 1120.310. Íon do peptídeo de sequência específica YGCYCGWGGR, do qual a sequência da BrTX-I foi deduzida.

O resultado da análise da estrutura primária mostrou que a BrTX-I é composta de 120 resíduos de aminoácidos (tabela 3), compartilhando as sequências conservadas de domínios comuns ao grupo das PLA₂ D49, incluindo as 14 cisteínas e a alça de ligação ao cálcio localizada em (Y)27, (G)29, (G)31, (G)32. Apesar do não sequenciamento da região correspondente ao sítio catalítico, a atividade fosfolipásica A₂ apresentada corrobora o fato de se tratar de uma PLA₂.

4.7 Caracterização biológica da PLA₂ BrTX-I.

4.7.1 Determinação *ex vivo* da atividade neurotóxica do veneno total e da BrTX-I.

No estudo da ação sobre a atividade neuromuscular na preparação biventer cervicis de pintainho, a concentração de 50 µg/mL do veneno total foi testada, assim como as concentrações de 5, 20, 50 e 100 µg/mL de BrTX-I. As figuras 16 a 18 mostram os registros miográficos do bloqueio da resposta contrátil, na preparação biventer cervicis de pintainho, produzidas pelo veneno total (figura 16) e pela PLA₂ BrTX-I (figuras 17 e 18). Em todas as concentrações das toxinas utilizadas, ocorreu bloqueio que não foi revertido após a lavagem com a solução de Krebs.

As concentrações testadas do veneno total (50 µg/mL) e da BrTX-I, (50 e 100 µg/mL) causaram um bloqueio irreversível e dose-dependente da transmissão neuromuscular ($p < 0.05$). O tempo requerido para o veneno total (50 µg/mL) levar a um bloqueio de 50% da amplitude de contração, sob estimulação indireta, foi $22,60 \pm 0,61$ minutos (figura 19). O tempo requerido para a BrTX-I levar a um bloqueio de 50% da amplitude de contração, também sob estimulação indireta, foi de $31,51 \pm 0,52$ minutos na concentração de 50 µg/mL e de $25,29 \pm 0,28$ minutos na concentração de 100 µg/mL (figura 19). O registro das amplitudes de contração da preparação controle permaneceu estável em média, a 98% ao longo dos 120 minutos de incubação com solução de Krebs.

Os resultados mostram que o bloqueio com 50 µg/mL de veneno ou da BrTX-I não foi acompanhado pela inibição significativa das respostas à acetilcolina (ACh) ainda que em doses cumulativas e ao potássio (KCl) apenas nas doses de 50 e 100 µg/mL apresentou diferença significativa. Nas preparações controle, a contratatura em resposta à adição de ACh e KCl se manteve estável após 120 minutos de estimulação indireta.

A figura 19 mostra a representação gráfica das respostas contráteis sob a ação do veneno total de *B. roedingeri* e de diferentes concentrações da PLA₂ BrTX-I respectivamente, evidenciando um bloqueio dose-dependente na transmissão neuromuscular, enquanto a figura 20 mostra as contraturas evocadas em resposta à adição de acetilcolina (ACh) e de potássio na forma de KCl, na preparação biventer cervicis de pintainho, sob ação de diferentes concentrações da BrTX-I (5, 20, 50 e 100 µg/mL).

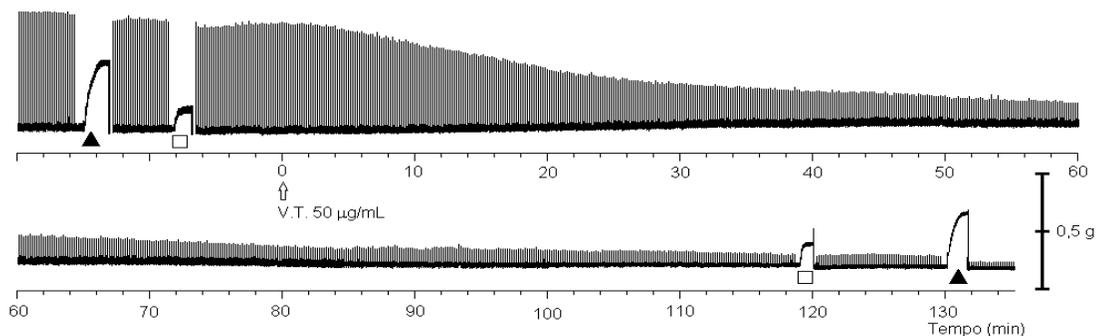


Figura 16. Registro miográfico do bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno total de *B. roedingeri* (50 µg/mL) na preparação *ex vivo* biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta supramaximal. Respostas do tecido à adição de ▲ KCl (13 mM) e □ ACh (55 µM) foram obtidas antes e após a adição do veneno de *B. roedingeri*.

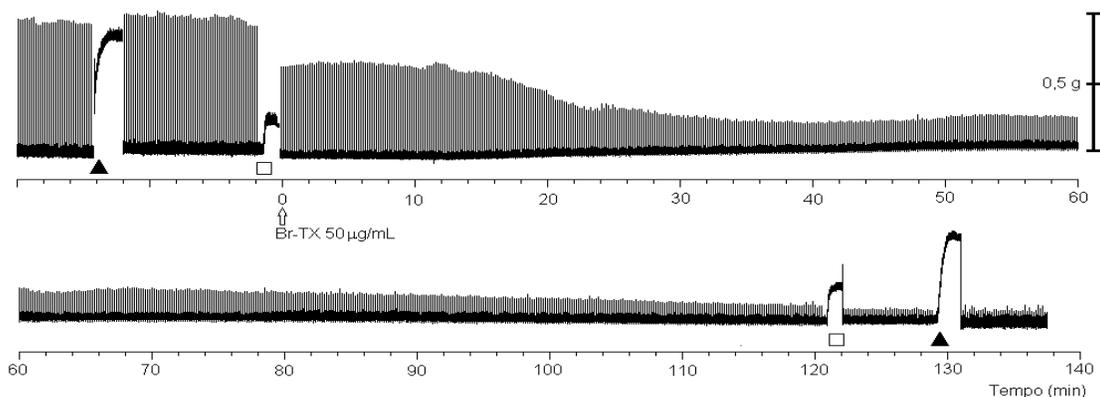


Figura 17. Registro miográfico do bloqueio neuromuscular induzido pela PLA₂ BrTX-I isolada do veneno de *B. roedingeri* (50 µg/mL), obtida por HPLC de Fase Reversa, na preparação *ex vivo* biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta supramaximal. Respostas do tecido à adição de ▲ KCl (13 mM) e □ ACh (55 µM), foram obtidas antes e após a adição da fração.

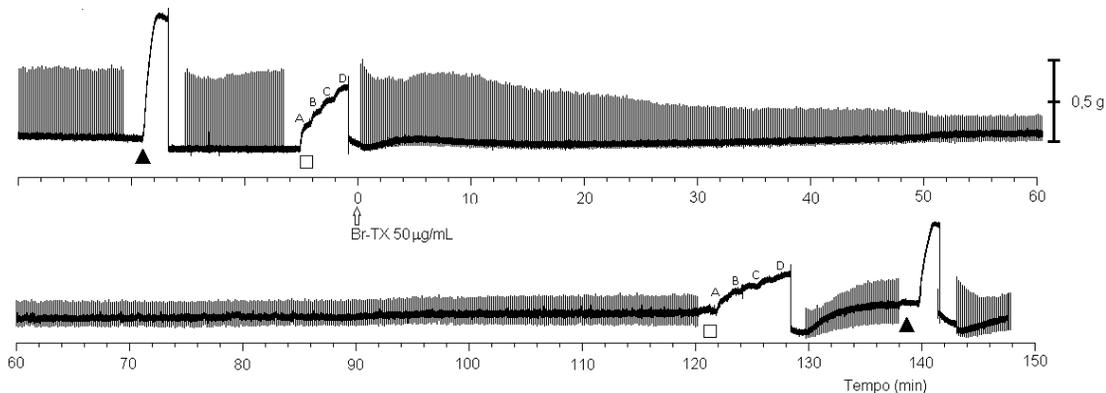


Figura 18. Registro miográfico do bloqueio neuromuscular induzido pela PLA₂ BrTX-I isolada do veneno de *B. roedingeri* (50 µg/mL), obtida por HPLC de Fase Reversa, na preparação *ex vivo* biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta supramaximal. Respostas do tecido à adição de ▲ KCl (13 mM) e □ ACh (A= 13,75 µM, B= 27,5 µM, C= 55 µM, D= 110 µM) foram obtidas antes e após a adição da fração.

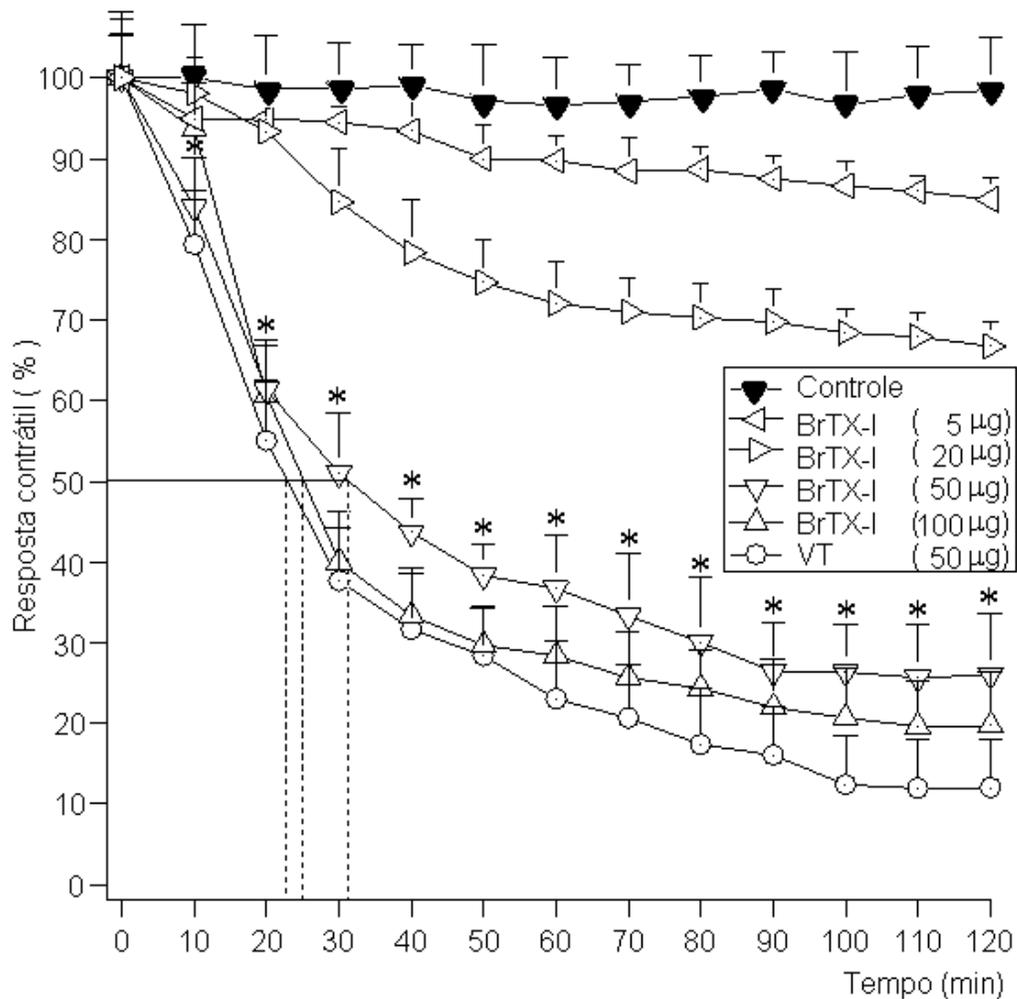


Figura 19. Bloqueio neuromuscular em preparação *ex vivo* biventer cervicis de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, após a adição do veneno total de *B. roedingeri* (50 µg/mL) ou da fração BII-4 (BrTX-I) nas concentrações de 5, 20, 50 e 100 µg/mL. Os pontos são as médias dos experimentos ± desvio padrão, $p < 0,05$, comparado ao controle. O tempo necessário para 50% do bloqueio das contrações para cada amostra está indicado pelas linhas pontilhadas verticais.

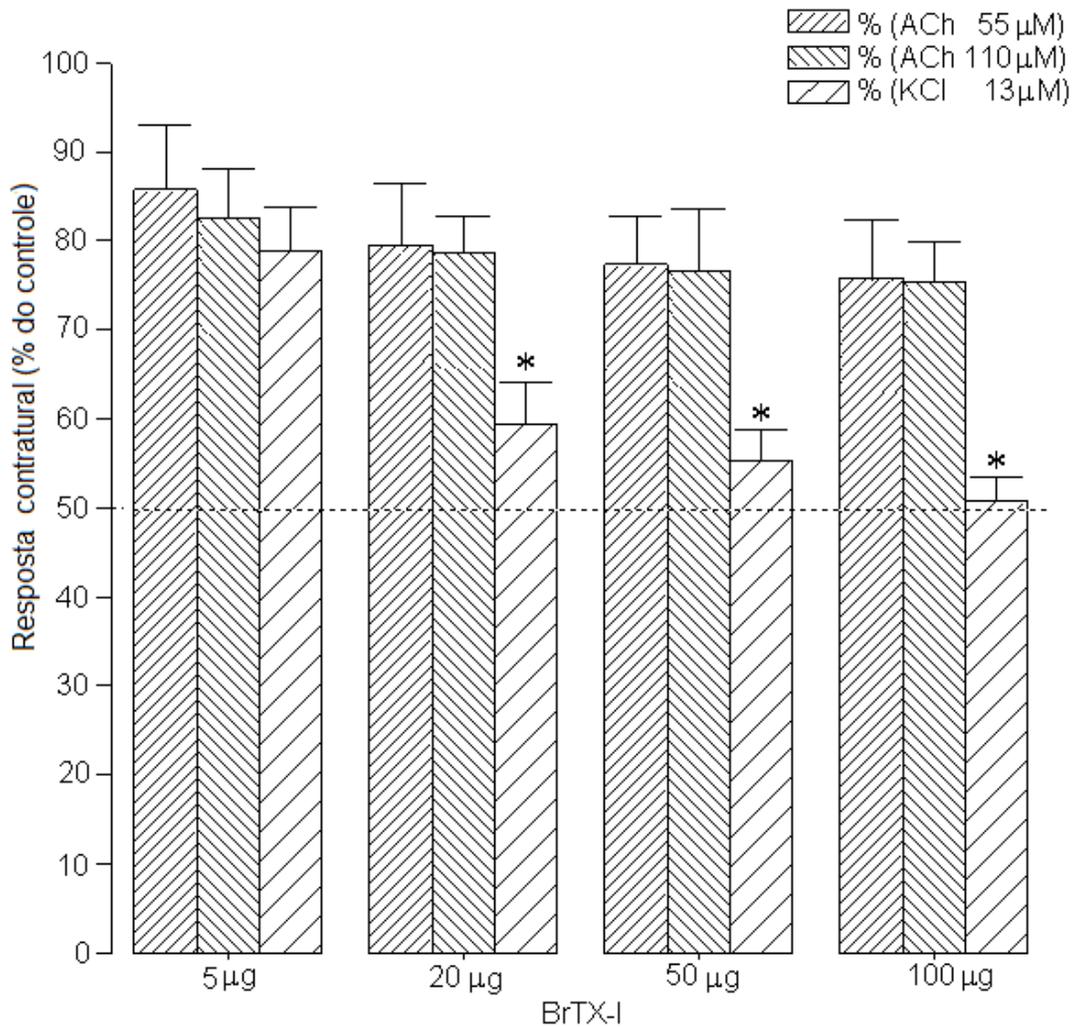


Figura 20. Percentagem de bloqueio da resposta contraturante à acetilcolina (ACh) e ao potássio, na forma de KCl, obtida após 120 minutos de incubação com diferentes concentrações da PLA₂ BrTX-I de *B. roedingeri*, em músculo biventer cervicis de pintainho (n=5). Nível de significância das amostras em relação ao controle (* $p < 0,05$). A linha pontilhada horizontal indica 50% de bloqueio das respostas contraturantes induzidas.

O fato da PLA₂ BrTX-I de *B. roedingeri* não afetar significativamente a resposta contraturante à adição de ACh e afetar a resposta ao KCl somente quando doses maiores da toxina são utilizadas, sugere que a BrTX-I apresenta atividade neurotóxica de natureza pré-sináptica.

4.7.2 Caracterização miotóxica da PLA₂ BrTX-I de *Bothrops roedingeri* através dos níveis de CK plasmáticos *in vivo*, após administração intramuscular e intravenosa

Um dos estudos, realizado para determinação do efeito miotóxico da PLA₂ BrTX-I *in vivo*, foi feito em camundongos administrados pela via intramuscular ou intravenosa com uma dose da BrTX-I de 20 µg.

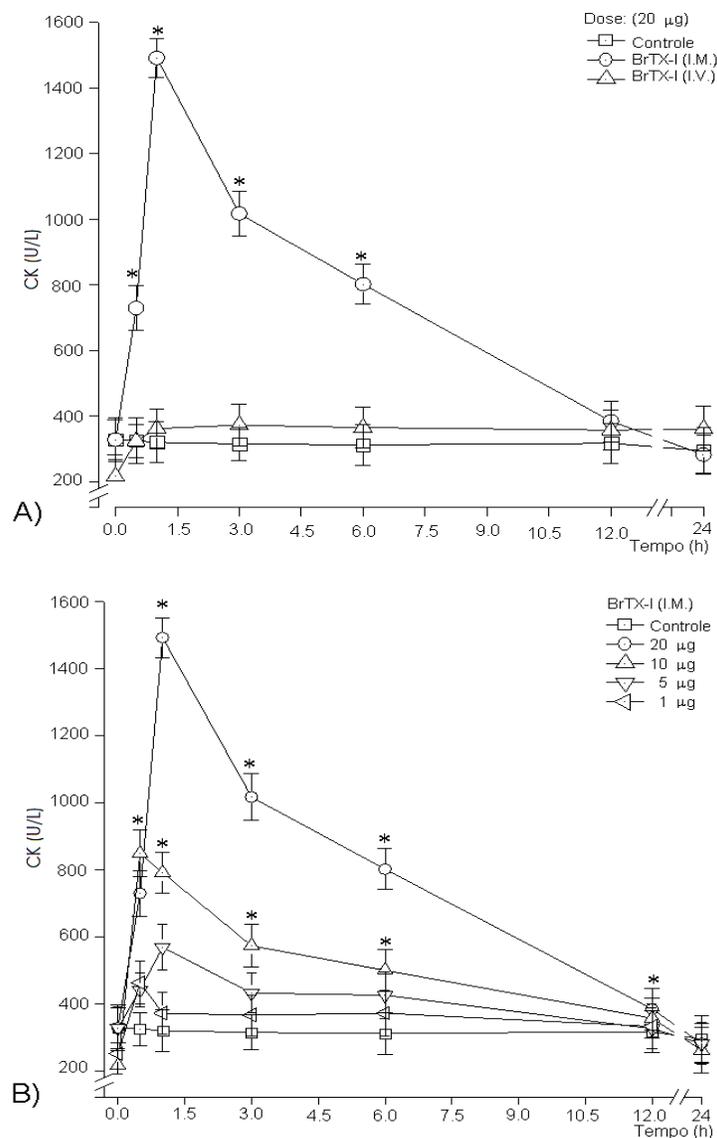


Figura 21. Representação gráfica da atividade miotóxica da PLA₂ BrTX-I de *B. roedingeri*, administrada em camundongos de 20 g de peso. O gráfico mostra em A, os níveis séricos de creatina quinase (CK) incrementados ao longo do tempo depois de administrada a toxina pela via intramuscular (○), intravenosa (△) e controle (□) (n=5). Em B observa-se que a atividade miotóxica local da BrTX-I é dose-dependente. Nível de significância das amostras em relação ao controle (* $p < 0,05$).

Os resultados mostraram que os níveis de CK plasmáticos aumentaram na primeira hora do tratamento, pela via intramuscular, atingindo até $1491,774 \pm 59,452$ U/L de CK, para voltar aos níveis normais, após 12 a 24 horas. O mesmo não ocorre pela via intravenosa que atinge níveis de $382,575 \pm 58,592$ U/L de CK (figura 21A). O outro estudo avaliou o efeito de concentrações diferentes da PLA₂ BrTX-I (1, 5, 10 e 20 µg) administradas a camundongos pela via IM. Os resultados mostram que os níveis de CK plasmáticos aumentaram na primeira hora do tratamento de forma dose-dependente (figura 21B).

4.7.3 Determinação da atividade edematogênica da PLA₂ BrTX-I isolada do veneno de *Bothrops roedingeri*

Uma das principais características do envenenamento botrópico é a formação de edemas volumosos, podendo até desencadear a síndrome compartimental. Estes edemas são resultados das ações pro inflamatórias das PLA₂ secretórias de serpentes do gênero *Bothrops*. O edema foi expresso como o percentual de aumento, em milímetros, da pata dos animais do grupo teste em relação à pata animais do grupo controle. A figura 22 mostra que a PLA₂ BrTX-I induziu edema significativo, como resultado de um aumento na permeabilidade vascular no lugar da aplicação da toxina aproximadamente duas horas após o tratamento.

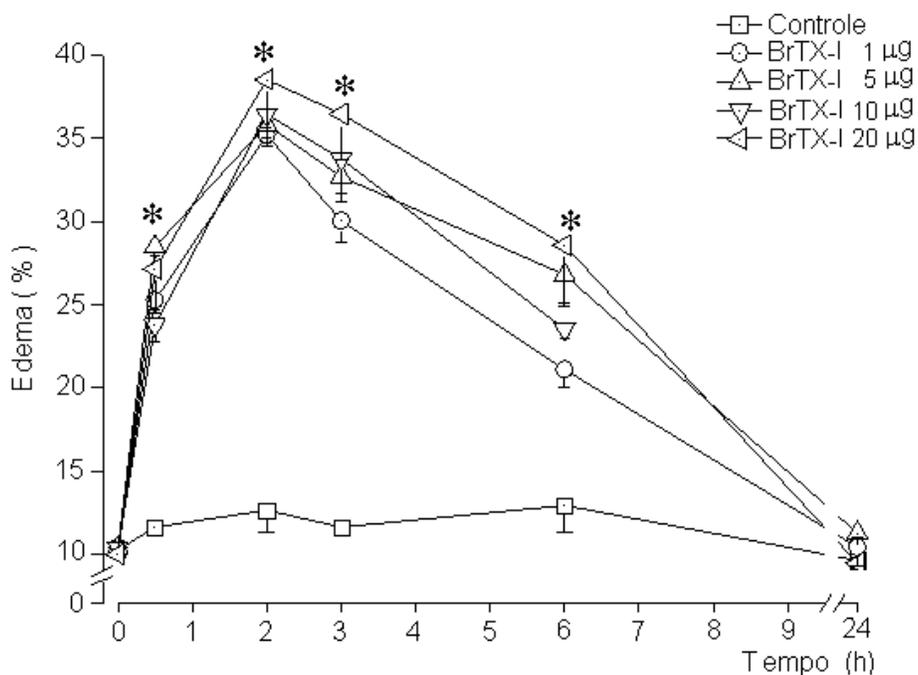


Figura 22. Atividade edematogênica da PLA₂ BrTX-I isolada de veneno de *B. roedingeri* em camundongos (18-20 g). Cada ponto representa a média \pm o desvio-padrão de um grupo de 5 animais. Os resultados foram calculados em porcentagem de edema em relação com o controle (PBS). Nível de significância das amostras em relação ao controle (* $p < 0,05$).

4.7.4 Dosagem das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α

Para analisarmos e compararmos os mecanismos dos eventos inflamatórios induzidos pela PLA₂ BrTX-I, as concentrações plasmáticas de IL-1, IL-6 e TNF- α foram determinadas. A PLA₂ BrTX-I causou um aumento significativo nas concentrações de TNF- α em apenas 1 hora (figura 23A) e nas concentrações de IL-1 e IL-6 entre 3 e 12 horas, tendo a IL-1 atingido o pico em 6 horas e a IL-6 em 3 horas (figuras 23B e C).

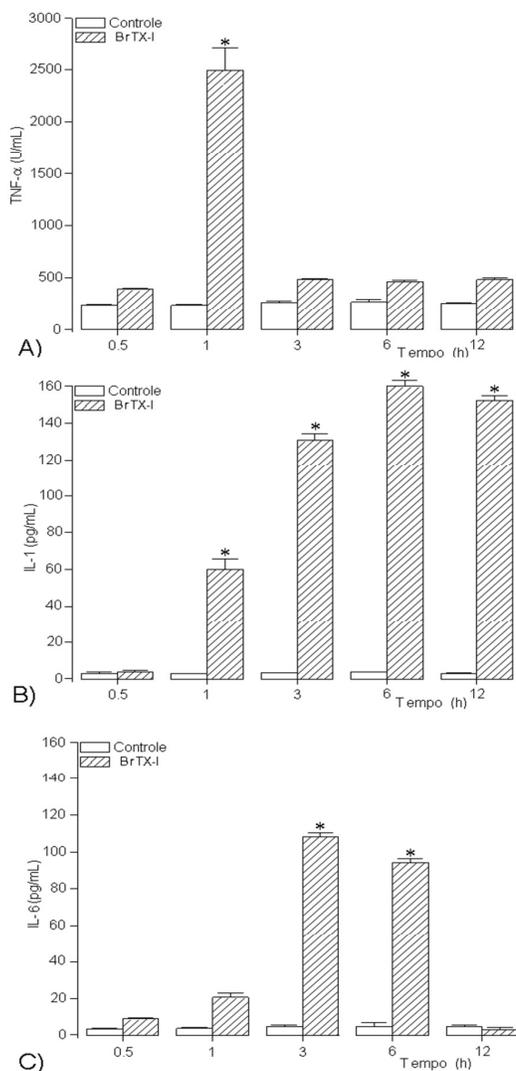


Figura 23. Em A, B e C, concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-1 e IL-6, respectivamente, após administração de BrTX-I. Foram injetados nos animais (I.M.) 1 mL de BrTX-I (1,0 mg/kg) ou solução fisiológica (NaCl, 0,9%) estéril como controle. As citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α foram quantificadas, por um imunoenensaio enzimático específico, no plasma colhido nos intervalos de tempo indicados, após administração de BrTX-I ou solução fisiológica. Cada barra representa a média mais desvio-padrão (n=5). (*) $p < 0,05$ quando comparado ao controle.

5. DISCUSSÃO

5.1. Purificação, caracterização físico-química e estrutural da PLA₂ BrTX-I

Na América do Sul, venenos de serpentes do gênero *Bothrops* vêm sendo estudados devido a sua predominância nos acidentes ofídicos e importância clínica em países como Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela, Bolívia e Peru, já que representam um problema de saúde pública, sendo estas serpentes as responsáveis por cerca de 90% dos acidentes ofídicos que ocorrem nestes países (OMS, 2010) o que corrobora os dados publicados pelo Ministério da Saúde do Brasil, no seu Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos (FUNASA, 2001).

As fosfolipases A₂ (PLA₂) ofídicas são proteínas pequenas, amplamente distribuídas entre as espécies de serpentes. Sabe-se que o veneno de serpente é uma rica fonte de PLA₂, sendo que estas enzimas possuem atividades tóxicas e/ou farmacológicas como: mionecrótica, anticoagulante inibidora da agregação plaquetária, cardiotoxica, hipotensora e edematogênica (Gutiérrez e Lomonte, 1997; Kini, 2003; Ponce Soto et al., 2007c). Em função das divergências naturais e a biodiversidade desta família de proteínas entre as serpentes de diferentes espécies e origens geográficas, a caracterização de novas variantes de PLA₂ pode prover conhecimentos relevantes para entender suas relações estrutura-função.

As fosfolipases A₂ provenientes de venenos botrópicos podem ser divididas em dois grandes grupos: aquelas que apresentam atividade enzimática, como as PLA₂ Asp49 e aquelas desprovidas de atividade catalítica, ou homólogas Lys49 (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Ownby et al., 1999; Ponce-Soto et al., 2007). Atualmente, muito pouco se sabe sobre o veneno de *B. roedingeri* e seus componentes. Portanto o presente trabalho torna-se referência para posteriores estudos dos componentes presentes no veneno e suas atividades biológicas. Estudos desta natureza podem produzir novos e valiosos instrumentos moleculares ou ainda, modelos moleculares para novos princípios farmacologicamente ativos.

PLA₂ procedentes do veneno botrópico têm sido exaustivamente purificadas usando uma combinação de métodos cromatográficos como exclusão molecular, troca iônica, HPLC de fase reversa e afinidade usando inibidores naturais, anticorpos e heparina (Gutiérrez e Lomonte, 1997; Geoghegan et al., 1999; Ownby et al., 1999; Andrião-Escarso et al., 2000; Ponce-Soto et al., 2006, 2007c, 2009, 2010).

O objetivo destas combinações de métodos é encontrar a técnica mais refinada ou a melhor combinação de técnicas cromatográficas que permitam isolar as PLA₂ mantendo as propriedades destas, tais como sua atividade enzimática e suas atividades biológicas, além de fornecer material com alto grau de homogeneidade molecular e quantidades razoáveis para a realização dos experimentos propostos. Com este objetivo Tsai et al. (2001) trabalhando com a serpente asiática *Calloselasma rhodostoma* mostraram uma combinação eficiente entre cromatografia de exclusão molecular (Superdex G75 HR 10/30 Pharmacia, Sweden) e fase reversa (C8 sílica gel, Vydac 14 x 250 mm). Bonfim et al. (2006) isolaram uma PLA₂ homóloga da mesma serpente. Ponce Soto et al. (2009), com a mesma combinação de técnicas, isolaram a BaTX, uma PLA₂ homóloga K49, a partir do veneno de *B. alternatus* com troca iônica e fase reversa em C-18.

A PLA₂ BrTX-I de veneno de *B. roedingeri* foi purificada usando um procedimento simples e rápido envolvendo duas etapas cromatográficas, exclusão molecular em Sephadex G-75 e HPLC de fase reversa (C18). O uso de bicarbonato de amônia (Sephadex G-75) e acetonitrila (RP-HPLC) como tampões têm a vantagem de que são facilmente eliminados por liofilização, suprimindo a necessidade de tirar o sal (dessalinizar) no caso de uso de acetato como tampão, como já foi demonstrado por Ponce Soto et al. (2010).

Os resultados obtidos utilizando-se a cromatografia de exclusão molecular convencional mostraram que o veneno de *B. roedingeri* pode ser resolvido em quatro frações (I–IV). As atividades PLA₂ e neurotóxica foram encontradas apenas no pico II (bandas entre 14 a 37 kDa). A cromatografia por hidrofobicidade em HPLC de fase reversa da fração II deu origem a 10 frações. No perfil de atividade destas frações, a fração II-4 identificada como BrTX-I, mostrou atividades fosfolipásica e neurotóxica no biomonitoramento.

Estes resultados demonstraram que a combinação da cromatografia de exclusão molecular com HPLC de fase reversa foi eficiente, principalmente a etapa de RP-HPLC que se mostrou bastante eficiente, proporcionando um grande aumento na atividade fosfolipásica A₂. A tabela de purificação demonstra a eficiência dos processos cromatográficos utilizados na purificação desta PLA₂, com rendimento de 22,5%. Além disso, houve preservação da seletividade, da capacidade de resolução, do alto grau de homogeneidade molecular e das atividades biológicas.

O perfil eletroforético obtido pela SDS-PAGE em gel de poliacrilamida (12,5%), da PLA₂ BrTX-I, revelou, em condições não redutoras uma única banda proteica de massa molecular relativa de ~14 kDa e quando reduzida com ditioneitol (DTT) mostrou também a presença de

uma única banda de massa molecular de ~14 kDa. Esses resultados confirmam que a fração BrTX-I apresenta uma só cadeia polipeptídica com massa molecular relativa ao redor de ~14 kDa, e está 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).

As atividades fosfolipásicas do veneno de *B. roedingeri* e da BrTX-I foram analisadas utilizando-se como substrato o ácido 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzóico (Holzer e Mackessy, 1996).

As PLA₂ (E.C.3.1.1.4) provenientes do veneno de serpentes são consideradas como PLA₂ de baixa massa molecular, extracelulares, e hidrolisam substratos em forma micelar e bicamadas ou lipídios dispersos. As PLA₂ exibem um grande aumento de sua atividade catalítica quando fosfolipídios isolados se agregam para formar micelas (Breithaupt, 1976; Holzer e Mackessy, 1996; Deems e Dennis, 2000).

A atividade fosfolipásica mostrou ser maior para a BrTX-I quando comparada com o veneno total, sendo a velocidade de reação do veneno total de $2,592 \pm 0,617$ nmoles/min/mg e para a BrTX-I de $16,868 \pm 0,643$ nmoles/min/mg. Esses valores são correspondentes aos encontrados em PLA₂ com atividade catalítica o que evidencia a presença do aminoácido aspartato na posição 49 da cadeia polipeptídica podendo ser classificado como uma PLA₂ como aquelas descritas para veneno botrópicos: as isoformas 6-1 e 6-2 de *B. jararacussu*, (Ponce Soto et al., 2006), PLA₂ BmTX-I de *B. moojeni* (Calgaroto et al., 2008), as isoformas BmjeTX-I e II de *B. marajoensis* (Ponce Soto et al., 2010).

A atividade PLA₂ da BrTX-I foi estudada usando diferentes concentrações do substrato cromogênico 4N3OBA, o qual evidenciou que esta enzima monomérica apresenta comportamento tipo sigmoidal discreto, principalmente em concentrações baixas do substrato. Este comportamento cinético de reação é típico das enzimas alostéricas com múltiplos centros ativos e operando de modo cooperativo. Porém esse mecanismo não parece ser usado pela BrTX-I, que é uma enzima monomérica com um único sítio ativo. Algumas proteínas como a glicocinase (enzima monomérica com um único sítio ativo) possuem uma cinética alostérica no início de sua ligação com o substrato (baixa afinidade), e proporciona uma alteração da arquitetura molecular do sítio ativo preparando essa região para a molécula de substrato seguinte, expressando agora uma alta afinidade (Cornish-Bowden e Cardenas, 1987).

A ligação com o substrato induz mudanças de conformação, de modo que ao final do ciclo catalítico a enzima mantém uma alta afinidade pela seguinte molécula de substrato sugerindo que

essa cooperatividade positiva obedece a um mecanismo mnemônico (Kamata et al., 2004). Certas PLA₂ apresentam uma tendência em formar agregados, dímeros, trímeros (Arni e Ward, 1996) proporcionando um efeito também característico de enzimas alostéricas. Alguns estudos a respeito de PLA₂ provenientes de serpentes crotálicas mostram que estas PLA₂ apresentam esse comportamento (Beghini et al., 2000; Ponce Soto et al., 2002) o mesmo ocorrendo para as isoformas de PLA₂ básicas 6-1 e 6-2 procedente de *B. jararacussu* (Ponce Soto et al., 2006), as isoformas BmjeTX-I e II de *B. marajoensis* (Ponce Soto et al., 2010), BmTX-I de *B. moojeni* (Calgaroto et al., 2008), BbTX-III de *B. brazillii* (Huanchuire-Vega et al., 2009). A BrTX-I estudada nesse trabalho não apresenta esta tendência de formar agregados (PAGE-SDS, RP-HPLC), sendo uma enzima monomérica com tendência alostérica sugerindo provavelmente um mecanismo de cooperatividade mnemônica positiva. Além disso, foram determinados os valores de *K_m* e *V_{max}* a partir do gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk da fração BtTX-II. Nas condições testadas o valor da constante *K_m* é 4,88 nmol e *V_{max}* 3,0 nmol/mg/min.

Com relação ao estudo cinético a atividade PLA₂ pode ser verificada frente a diferentes faixas de pH; o pH ótimo para a PLA₂ em estudo mostra ser comum com outras PLA₂, cujos valores ótimos se encontram na faixa entre 7 e 8,5 (Kini, 1997; Breithaupt, 1976; Bonfim et al., 2001, Ponce Soto et al., 2002, 2006, 2010). Assim temos que a BrTX-I pode ser considerada básica ao evidenciar sua atividade ótima ao redor de um pH de 8,0.

Outro parâmetro cinético utilizado para se caracterizar PLA₂ (Asp49) é a temperatura. Tem sido registrado que a PLA₂ de *Naja naja naja* é altamente estável a temperaturas extremas de até 100 °C (Kini, 1997), assim como a PLA₂ de *C. d. terrificus* que mostra uma alta atividade a temperaturas em torno de 53-57 °C (Breithaupt, 1976); a temperatura ótima para atividade da BrTX-I foi em torno de 37 °C, e mesmo a 40-45 °C, esta ainda apresentava moderada atividade enzimática. Os resultados de pH e temperatura ótimos corroboram a afirmação de que a BrTX-I purificada está entre o grupo das PLA₂.

A BrTX-I mostrou ser uma PLA₂ Ca²⁺ dependente como outras PLA₂, já que na ausência de Ca²⁺ a mesma perdeu totalmente sua atividade catalítica. A BrTX-I apresentou atividade com apenas 1 mM de Ca²⁺. Ao adicionarmos íons Zn²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ e Cd²⁺ (10 mM) ocorreu uma diminuição da atividade catalítica. A substituição de 10 mM Ca²⁺ por 10 mM dos outros cátions reduziu a atividade para níveis similares aos encontrados na ausência de Ca²⁺. Ponce Soto e colaboradores (2002) observaram o mesmo para PLA₂ (F6) do veneno de *C. d. collilineatus*. O íon Ca²⁺ direciona o posicionamento do substrato no sítio ativo da enzima e parece que esse

arranjo do sítio catalítico apresenta uma estrutura exclusiva para o raio atômico do Ca^{2+} o que explicaria a diminuição da atividade PLA_2 na presença de outros íons (Scott et al., 1994).

A presença de resíduos carregados positivamente, tais como Lisina, Histidina e Arginina tanto nas PLA_2 quanto nas PLA_2 homólogas (K49), está relacionada com possíveis efeitos farmacológicos (Gutiérrez e Lomonte, 1995, Kini 2003, Ponce Soto et al., 2006, 2007, 2010). O teste de atividade inibitória da crotapotina permitiu verificar que a PLA_2 BrTX-I encontrou-se inibida em torno de 60% frente à crotapotina de *C. d. terrificus* (Figura 12.F) e com estes resultados pode-se inferir que haja uma crotapotina-like também nos venenos botrópicos, capaz de inibir a atividade catalítica das PLA_2 D49, com isso a baixa atividade catalítica dos venenos botrópicos pode ser parcialmente explicada como já discutido por Bonfim et al., 2001.

A análise da composição de aminoácidos da BrTX-I apresentou um importante nível de semelhança estrutural na análise de composição de aminoácidos, com outras PLA_2 procedentes do veneno botrópico. A análise da composição de aminoácidos mostra a presença de uma grande quantidade de aminoácidos tanto de caráter básico quanto hidrofóbico; a presença de 14 Cys é indicativo de possuir 7 pontes dissulfeto, as quais estabilizam a estrutura terciária da proteína, e sua cadeia polipeptídica é constituída de 120 resíduos de aminoácidos. Os estudos obtidos por espectrometria de massas (ESI-MS) mostraram que a PLA_2 BrTX-I apresenta uma massa molecular de 14.358,69 Da, confirmando a massa relativa de ~14 kDa obtida pelo PAGE-SDS, própria desta família de proteínas (Arni e Ward 1996). A BrTX-I apresentou uma única banda eletroforética em SDS-PAGE, o que demonstrou sua homogeneidade molecular.

Estudos de homologia sequencial têm mostrado que existem determinadas posições extremamente conservadas nas PLA_2 . Na posição 1 e 2 predomina a sequência de aminoácidos (SL), na posição 4 (Q), na posição 7 a 10 (KMIL), na posição 25-26 e 28-29 (GC e CG) conforme Arni e Ward, 1996. Nas PLA_2 existem vários resíduos conservados que também possuem um papel fundamental na expressão da atividade PLA_2 . Assim temos que as sequências de aminoácidos W/YCG-G (27, 28, 29 e 30) são essenciais para a formação da alça de ligação do cálcio (Arni e Ward, 1996). De acordo com o estudo de homologia sequencial realizado com a BrTX-I, existem algumas diferenças detectáveis, por exemplo, a substituição de (S) por (D) na posição 1; (L) por (K) na posição 10. Apesar destas mudanças, não houve diminuição da atividade catalítica nem farmacológica.

5.2. Caracterização farmacológica *ex vivo* e *in vivo* da PLA₂ BrTX-I

5.2.1 Atividade Neurotóxica

A atividade muscular esquelética é coordenada pelo sistema nervoso central e periférico somático. O neurônio motor do sistema nervoso somático faz contato com a fibra muscular em uma região extremamente especializada do sarcolema denominada placa motora terminal. Esta sinapse química entre o neurônio motor e a fibra muscular é denominada de junção neuromuscular (JNM). A figura 24 esquematiza morfologicamente a JNM e descreve os eventos que ocorrem durante o processo da neurotransmissão.

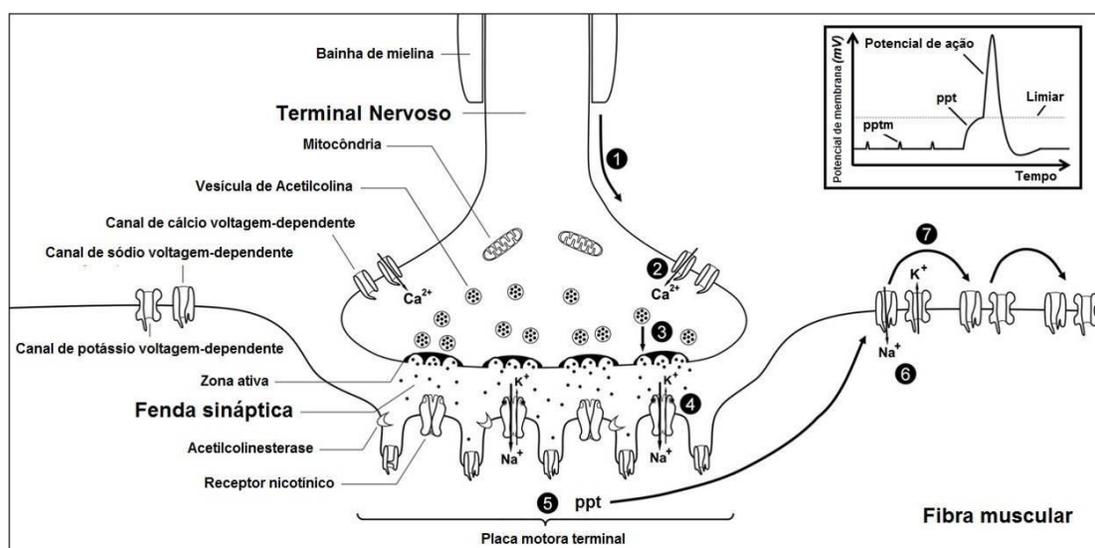


Figura 24. Diagrama da junção neuromuscular com os principais eventos do processo da neurotransmissão. A chegada de um potencial de ação promove a despolarização do terminal nervoso (1). Como consequência os canais de cálcio voltagem-dependentes se abrem e promovem um influxo de Ca^{2+} para o terminal nervoso (2). As vesículas sinápticas se fundem com a membrana pré-sináptica liberando acetilcolina para a fenda sináptica (3). A acetilcolina interage com os receptores nicotínicos abrindo o canal iônico (4). O influxo predominante de sódio resulta numa despolarização local da placa motora terminal, que é o potencial de placa terminal (5). A propagação eletrotônica do potencial de placa terminal para a zona perijuncional ativa os canais de sódio e potássio voltagem-dependentes (6). Se o limiar de excitabilidade da fibra muscular for atingido (inserto na figura), um potencial de ação é deflagrado, iniciando o processo de contração muscular (7). Em repouso, a liberação espontânea e aleatória de vesículas isoladas de acetilcolina resulta em uma despolarização subliminar da região da placa motora terminal, resultando nos potenciais de placa terminal em miniatura (detalhe). ppt, potencial de placa terminal; pptm, potencial de placa terminal em miniatura; K^+ , íons potássio (Adaptado de Gallacci e Cavalcante, 2010).

Neurotoxinas presentes nos venenos ofídicos causam bloqueio da transmissão na junção neuromuscular, atuando pré-juncionalmente ao bloquearem a exocitose da acetilcolina (ACh)

pelo terminal nervoso pré-sináptico, ou pós-juncionalmente por bloqueio dos receptores colinérgicos pós-sinápticos. Estes diferentes mecanismos de ação podem ser facilmente diferenciados usando-se a preparação *ex vivo* nervo frênico-diafragma de camundongo, mas eles também podem ser diferenciados usando-se preparação *ex vivo* biventer cervicis de pintainho (BCp) (Harvey et al., 1994; Harvey e Robertson, 2004).

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

No entanto, como regra, os venenos bem como suas toxinas atuam periféricamente na junção neuromuscular. Assim, estudos têm mostrado que espécies botrópicas possuem efeito neurotóxico *in vitro*, como reportado por Costa et al. (1999) que evidenciou que o veneno de *B. pirajai* possui um efeito miotóxico e neurotóxico *in vitro*, capaz de bloquear a resposta contrátil na preparação extensor digitorum longus (EDL) de rato e Gallacci e Cavalcante (2010) que propuseram um mecanismo de ação neurotóxica *in vitro* para as PLA₂ homólogas Lys49. Cogo et al. (1998), demonstraram que o veneno de *B. insularis* também possui um efeito neurotóxico *in vitro* na preparação músculo biventer cervicis de pintainho em concentrações que não afetam as respostas contraturantes a ACh e ao KCl e nem mesmo interfere sobre a liberação de CK. Posteriormente, Araújo et al. (2002) também observaram que tanto o veneno como uma fração caseinolítica de *B. lanceolatus* possuem um efeito neurotóxico *in vitro* sobre a preparação músculo biventer cervicis de pintainho, assim como os estudos eletrofisiológicos mostraram que o veneno total é capaz de aumentar ligeiramente a amplitude e frequência dos potenciais de placa em miniatura (PPM).

Os resultados descritos neste trabalho mostram claramente que o veneno de *B. roedingeri* contém substância(s) que exibe(m) atividade neurotóxica em preparação *ex vivo* biventer cervicis de pintainho. A caracterização da atividade neurotóxica *ex vivo* feita a partir do veneno total de *B. roedingeri*, e da enzima purificada PLA₂ BrTX-I no modelo biventer cervicis de pintainho, demonstrou que o veneno de *B. roedingeri* foi capaz de levar à diminuição da resposta contrátil em 50% no modelo *ex vivo* biventer cervicis de pintainho, em um tempo menor que os outros venenos avaliados em testes preliminares, demonstrando assim uma maior potência no bloqueio

da transmissão na junção neuromuscular quando comparada aos venenos de outras serpentes do gênero *Bothrops*.

Tabela 5: Tempo necessário para o bloqueio de 50% da amplitude da contração muscular por diferentes venenos botrópicos (preparação biventer cervicis de pintainho).

Serpente	Concentração do veneno	Tempo (min) para 50% de bloqueio das contrações
<i>B. roedingeri</i>	50µg/mL	22,60 ± 0,61
<i>B. insularis</i> **	80µg/mL	44,0
<i>B. neuwiedi</i> *	50µg/mL	45,0
<i>B.n. pauloensis</i> ***	50µg/mL	40,0 ± 12
<i>B. erythromelas</i> *	50µg/mL	87,0
<i>B. moojeni</i> *	50µg/mL	95,0
<i>B. jararaca</i> *	50µg/mL	107,3
<i>B. jararacussu</i> *	50µg/mL	> 120,0

*Rodrigues-Simioni et al., 2004. **Cogo et al., 1993. ***Durigon et al., 2005.

A maior atividade neurotóxica *ex vivo* da BrTX-I, sobre a junção neuromuscular na preparação biventer cervicis de pintainho, está provavelmente relacionada com a maior afinidade entre o sítio farmacológico específico desta PLA₂ e o sítio-alvo da membrana plasmática do terminal nervoso do motoneurônio, bloqueando de maneira mais eficaz a exocitose do neurotransmissor ACh na fenda sináptica. De acordo com Kini e Evans (1989), diferentes PLA₂ de venenos, apesar de administradas pela mesma via, podem induzir diferentes efeitos farmacológicos ou diferentes graus de atividade farmacológica.

Os resultados mostraram que o bloqueio obtido com 50 µg/mL da toxina não foi acompanhado pela inibição significativa das respostas contraturais à acetilcolina (ACh) ainda que em doses cumulativas e nem às doses menores de potássio (KCl). Isto significa que o veneno e a fração exibiram efeito neurotóxico preponderantemente pré-sináptico na preparação. Neurotoxinas ativas pré-sinápticamente são capazes de abolir a resposta contrátil sem afetar a resposta aos agonistas colinérgicos (Lewis e Gutmann, 2004).

Um provável mecanismo para a ação neurotóxica pré-sináptica das PLA₂ cataliticamente ativas foi proposto por Montecucco e Rosseto em 2000 (figura 25), onde de acordo com os autores, as moléculas de PLA₂ neurotóxicas de venenos ofídicos penetram no lúmen das vesículas sinápticas do terminal nervoso na JNM, no momento da exocitose da acetilcolina para a fenda sináptica. Após a liberação do neurotransmissor, a vesícula se interioriza no terminal nervoso por endocitose e as PLA₂ no seu interior hidrolisam os fosfolipídios do folheto interno da

membrana das vesículas gerando ácidos graxos e lisofosfolídeos. As vesículas sinápticas utilizam bombas de prótons para gerar um gradiente de pH transmembrana que possibilite a recaptação da acetilcolina e reabastecimento das vesículas. Este gradiente de pH direciona a translocação dos ácidos graxos para a monocamada citosólica (folheto externo), permanecendo os lisofosfolídeos na camada luminal (folheto interno).

Assim as atividades da bomba de prótons e da PLA₂ combinadas criam uma distribuição assimétrica dos ácidos graxos e lisofosfolídeos. Os ácidos graxos insaturados na monocamada lipídica contactante e os lisofosfolídeos na monocamada distal promovem a fusão da membrana (Chernomordik et al., 1995,1997). Desta forma, tais vesículas se tornam altamente fusogênicas e liberam o neurotransmissor após a fusão com a membrana pré-sináptica em qualquer ponto, mesmo onde não ocorre normalmente a exocitose da ACh no terminal nervoso, mas não podem ser restauradas devido à alta concentração de ácidos graxos e lisofosfolídeos, os quais impedem o fechamento do lúmen das vesículas, levando ao bloqueio da neurotransmissão.

A facilitação da neurotransmissão, evidenciada experimentalmente pelo aumento das respostas contráteis (bifásica), é uma característica comumente encontrada em venenos ou neurotoxinas com ação pré-sinápticas, como a crotoxina (Hawgood e Smith, 1989), a notexina (Su e Chang, 1984) e a PLA₂ de *B. insularis* (Cogo et al., 1993). A facilitação indica um aumento transitório da liberação do neurotransmissor acetilcolina pelo terminal nervoso pré-sináptico antes do início do bloqueio, fato não observado utilizando-se o veneno total ou a PLA₂ BrTX-I nas doses farmacologicamente efetivas.

Por esta razão podemos inferir que estas diferentes toxinas PLA₂ devem atuar em sítios-alvos pré-sinápticos diferentes na junção neuromuscular, de acordo com Kini e Evans (1989a). De acordo com este modelo, provavelmente há mais de um sítio-alvo no lado pré-sináptico da JNM e cada tipo de neurotoxina pré-sináptica se liga especificamente a um alvo particular, apresentando comportamentos diferentes quanto às características do bloqueio. Se isto for verdade, pode-se esperar potenciação mútua entre toxinas, o que já foi observado anteriormente por Chang e Su (1980).

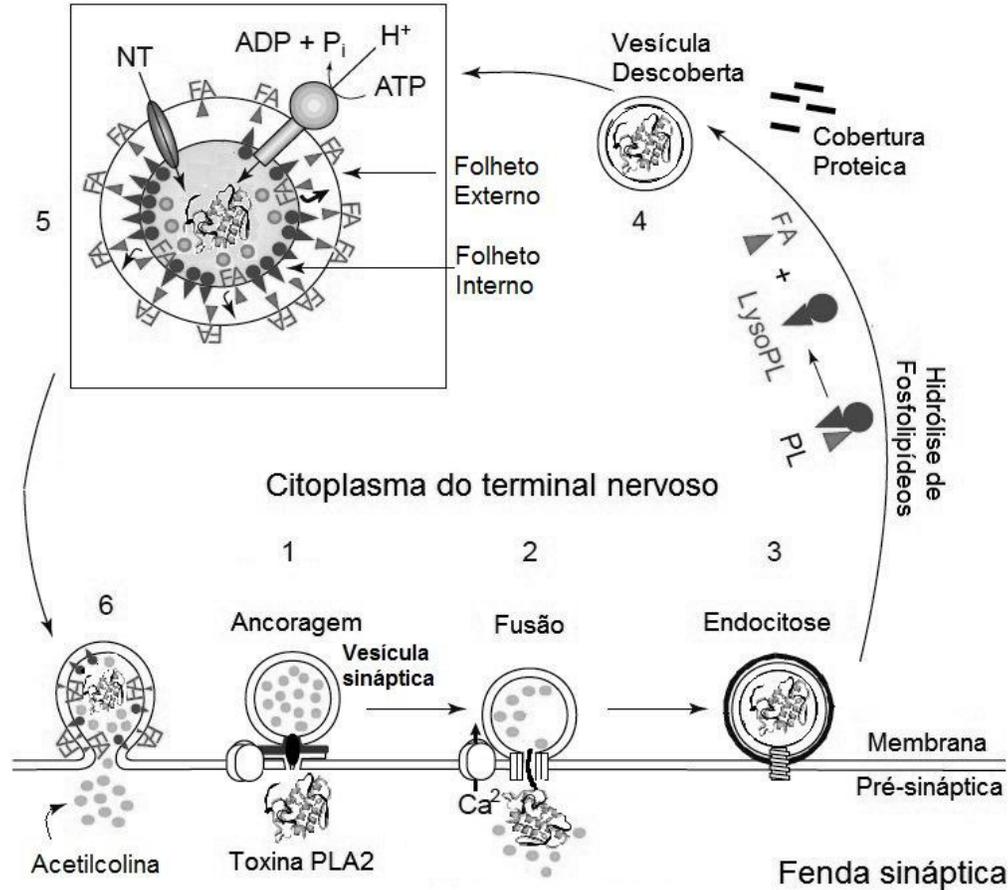


Figura 25. Reciclagem das vesículas sinápticas no terminal nervoso e possível modo de ação de neurotoxinas ofídicas pré-sinápticas PLA₂. Os passos indicados são na figura inicialização (priming) pelo ATP (1) e fusão (2) da vesícula com a membrana pré-sináptica que após exocitose se interioriza por endocitose no terminal nervoso (3). A PLA₂ hidrolisa os fosfolípidios do folheto interno da membrana, gerando ácidos graxos e lisofosfolípidios. Após o descarte das proteínas que mediarão a endocitose (4), a operação da bomba de prótons-ATPase (5) causa protonação e translocação dos ácidos graxos para a camada citosólica, deixando os lisofosfolípidios no lado luminal. As vesículas após exocitose não podem ser restauradas devido à alta concentração de ácidos graxos e lisofosfolípidios, os quais impedem o fechamento canal luminal das vesículas, levando ao bloqueio da neurotransmissão (NT), FA, ácido graxo (triângulo); LysoPL, lisofosfolípidio (cone invertido/círculo); ATP, trifosfato de adenosina; ADP, difosfato de adenosina; Pi, fosfato inorgânico; H⁺, próton do hidrogênio. (Adaptado de Montecucco e Rossetto, 2000).

Além da ação pré-sináptica principal, a maioria destas toxinas atua, também, em doses geralmente maiores, na membrana das fibras musculares, onde podem provocar diminuição ou perda da excitabilidade e mionecrose (Gopalakrishnakone e Hawgood, 1984).

Estas observações sugerem que nas concentrações estudadas, o veneno total de *B. roedingeri* e a BrTX-I não tiveram efeito inibitório nos receptores pós-sinápticos colinérgicos e

nem causaram dano muscular que impedisse totalmente a contratura em resposta ao KCl, apenas reduzindo a amplitude da contratura em doses mais elevadas, mantendo assim preservadas as respostas pós-sinápticas da junção neuromuscular, indicando que o bloqueio envolve principalmente uma neurotoxicidade pré-sináptica.

Desde o final dos anos 80, novas abordagens teóricas têm sido utilizadas para localizar os sítios farmacológicos específicos nas enzimas PLA₂ de venenos ofídicos (Kini e Evans, 1989). A neurotoxicidade pré-sináptica parece estar associada com a região hidrofóbica entre os resíduos 80 e 110 (Kini e Iwanaga, 1986a). As PLA₂ não neurotóxicas não possuem esta região hidrofóbica na molécula (Kini e Iwanaga, 1986a). O sítio para a neurotoxicidade pré-sináptica da molécula também foi previsto pela comparação direta das sequências de aminoácidos por Dufton e Hider (1983), por hidrofobicidade do sítio da interface de reconhecimento (Dufton et al., 1983), e pela distribuição de resíduos carregados, hidrofobicidade e momentos dipolo das hélices (Tsai et al., 1987).

Nossos estudos de análise estrutural demonstraram que a PLA₂ BrTX-I apresentou na região entre os resíduos 80 a 110, a sequência de aminoácidos EDLPC-----KAAAVCFYENLGTYNKK--, com predominância de aminoácidos hidrofóbicos e polares sem carga, conforme previsto por Kini e Iwanaga, em 1986 e Dufton e Hider em 1983, para os sítios farmacológicos neurotóxicos pré-sinápticos das PLA₂.

Estudos de densidade de distribuição de cargas indicam um padrão específico de distribuição de cátions no lado amino terminal da hélice E hidrofóbica, apenas em PLA₂ miotóxicas (Kini e Iwanaga, 1986). Este sítio catiônico miotóxico distinto é ausente em PLA₂ não miotóxicas. Todos os sítios previstos estão localizados na superfície da molécula de PLA₂ e podem interagir facilmente com os sítios-alvo nas células (Kini e Evans, 1987; Kini e Iwanaga, 1986a, 1986b). Todas estas previsões indicam a presença de sítios específicos associados com uma atividade farmacológica particular e a ausência de tais sítios resulta na ausência destes efeitos farmacológicos.

5.2.2 Atividade Miotóxica

No estudo da relação estrutura-função das PLA₂, é importante analisar também os efeitos farmacológicos *in vivo* e em outras espécies. Nossos estudos das atividades miotóxica e pró-inflamatória da BrTX-I, foram realizados *in vivo* utilizando-se camundongos, através dos ensaios de atividade edematogênica, de dosagem plasmática dos mediadores inflamatórios IL-1, IL-6 e

TNF- α e da enzima muscular creatina-quinase (CK), nos permitindo analisar melhor os efeitos pró-inflamatórios exibidos pela PLA₂ BrTX-I presente no veneno de *B. roedingeri*.

Segundo o proposto por Gutiérrez e Ownby (2003), as PLA₂ são os componentes miotóxicos mais importantes nos venenos de serpentes, induzindo eventos de degeneração muscular. Miotoxinas de serpentes, normalmente são proteínas pequenas e/ou peptídeos, e geralmente podem ser definidas como componentes naturais de secreções de glândula de veneno que induzem lesão no local da mordida, o que pode causar permanentes danos no tecido muscular, inaptidão e amputação de membros afetados (Rosenfeld, 1971). Desta forma, um crescente interesse em componentes do veneno responsáveis pela mionecrose e seu modo de ação tem ocorrido durante as últimas décadas (Gutiérrez e Ownby, 2003).

As PLA₂ miotóxicas ligam-se aos aceptores da membrana plasmática, que podem ser glicoproteínas ou proteínas (Kini e Evans, 1989), apresentando assim diferentes graus de afinidade pelas PLA₂. A partir dessa ligação, as PLA₂ miotóxicas produzem uma destruição da membrana através de mecanismos catalíticos ou mecanismos independentes de atividade PLA₂, no entanto, provocam uma entrada de Ca²⁺ bastante pronunciada e que, por sua vez, produzem uma série de eventos degenerativos associados à ativação de PLA₂ citosólicas e mitocondriais Ca²⁺ dependentes (Gutiérrez e Ownby 2003).

Os estudos de miotoxicidade do veneno total e da PLA₂ BrTX-I de *B. roedingeri*, evidenciaram um efeito miotóxico local *in vivo*, devido ao aumento dos níveis plasmáticos de creatina quinase (CK), apenas quando administrados via intramuscular (IM) em camundongo, revelando deste modo um dano muscular localizado de forma dose-dependente o qual alcançou o máximo 1h após a administração da PLA₂ BrTX-I.

As miotoxinas PLA₂ do veneno botrópico caracterizam-se por induzir dano muscular localizado, de ação rápida, sendo que pouca miotoxicidade adicional ocorre após esse dano inicial. Provavelmente esta PLA₂ BrTX-I, não tenha especificidade e se una às células musculares e não musculares no lugar da injeção. Esta ideia concorda com a hipótese de ação diferenciada para miotoxinas que agem local ou sistemicamente, proposta por Gutiérrez e Ownby, (2003) e a hipótese geral proposta por Kini e Evans (1989), onde se explica a especificidade farmacológica das PLA₂ de venenos. Estas PLA₂ miotóxicas locais unem-se predominantemente a diferentes tipos celulares, além de fibras musculares e chegam a ser rapidamente sequestradas após a injeção. Por outro lado, as PLA₂ miotóxicas sistêmicas como as PLA₂ F6 e F6a de *C. d. collilineatus* (Gutiérrez et al., 2008) possuem alta seletividade para fibras musculares esqueléticas

e não se unem às outras células. Esta especificidade permite as miotoxinas sistêmicas difundirem além do sítio de injeção alcançando a corrente sanguínea e células musculares distantes, causando rabdomiólise.

5.2.3 Atividade Inflamatória

Inflamação uma das principais características dos acidentes ofídicos com serpentes do gênero *Bothrops* no Brasil (FUNASA, 2001). A inflamação pode ser definida como um complexo de alterações teciduais em decorrência de uma lesão, onde diversas substâncias são liberadas pelos tecidos danificados, como histamina, bradicinina, serotonina, prostaglandinas, produtos do sistema complemento, produtos do sistema de coagulação e linfocinas, causando grandes alterações secundárias nos tecidos não lesionados ao redor. Caracteriza-se por vasodilatação local, aumento da permeabilidade das vênulas pós-capilares com extravasamento de plasma para o tecido, coagulação do plasma devido ao fibrinogênio e outras proteínas plasmáticas, migração de granulócitos e monócitos para os tecidos, dilatação das células teciduais (Guyton, 2006).

Os coágulos de fibrinogênio bloqueiam os espaços teciduais e vasos linfáticos da área inflamada causando um “emparedamento” que retarda a disseminação de bactérias e toxinas. A intensidade do processo inflamatório é proporcional ao grau de lesão tecidual. Inicialmente macrófagos teciduais são ativados e mobilizados pelos mediadores inflamatórios. A seguir neutrófilos em grande número vindos do sangue invadem a área inflamada sob a influência de agentes quimiotáticos como os leucotrienos (Garcia-Leme et al., 1973; Ryan e Majno, 1977; Granger e Kubes, 1994). Durante a fase aguda da inflamação, os neutrófilos são as primeiras células que migram para os tecidos lesados (Teixeira et al., 2003).

A aderência envolve uma interação fraca entre as moléculas de adesão presentes nas células endoteliais (selectinas) com seus ligantes presentes nos neutrófilos e as integrinas dos neutrófilos com seus ligantes nas células endoteliais. O fluxo sanguíneo quebra as fracas ligações, que voltam a se formar mais adiante ocasionando o rolamento da célula. Este rolamento estimula a liberação de quimiocinas tanto pelos leucócitos como pelas células endoteliais, aumentando assim a afinidade das integrinas presentes na membrana celular do neutrófilo pelos ligantes das células do endotélio (TNF- α e IL-1 aumentam a expressão de ligantes pelo endotélio, segundo Stylianou e Saklatvala (1998), até sua adesão estável e transmigração pela parede do endotélio até o tecido lesionado (Garcia-Leme et al., 1973; Granger e Kubes, 1994). Todos os passos na

cascata de recrutamento são regulados pelas moléculas de adesão celular ou CAM, em inglês (cell-adhesion molecules), tanto nos neutrófilos quanto nas células endoteliais (Teixeira et al., 2009). A sequência de expressão e função das CAMs é regulada por uma série de mediadores inflamatórios (Hubbard e Rothlein, 2000; Kaplanski et al., 2003).

São principalmente os neutrófilos e os macrófagos teciduais do sistema retículo-endotelial que atacam e destroem os agentes invasores e tóxicos. Os macrófagos teciduais começam sua vida como monócitos (imaturos) no sangue e amadurecem nos tecidos, enquanto os neutrófilos (maduros) podem atuar nos tecidos e no sangue. Agentes quimiotáticos como os leucotrienos atraem os neutrófilos para o tecido inflamado. (Guyton, 2006).

O reconhecimento, pelos macrófagos teciduais, de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP) no microrganismo (por exemplo, toxina) desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias dos macrófagos: a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α). Essas citocinas atuam sobre as células endoteliais das vênulas pós-capilares, causando a expressão dos fatores de adesão aos quais aderem os neutrófilos.

Um importante mediador relacionado ao aumento da permeabilidade da microvasculatura é a histamina. A histamina é sintetizada em quase todos os tecidos de mamíferos a partir da histidina, pela ação da enzima L-histidina descarboxilase presente nestas células e principalmente pelos mastócitos, células do tecido conjuntivo que produzem heparina e histamina sendo os locais predominantes de armazenamento da histamina nos tecidos (Goodman & Gilman, 2005). A histamina é armazenada em grânulos e liberada por exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas.

Os estímulos incluem a interação de certos anticorpos e dos componentes do complemento C3a e C5a com receptores específicos na membrana do mastócito. A histamina atua nos receptores H₁ das células endoteliais das vênulas pós-capilares, promovendo sua contração e separação nos seus limites, expondo a membrana basal que é permeável à proteína e ao líquido do plasma, e também aos neutrófilos recrutados (Goodman e Gilman, 2005).

O exsudato plasmático, que leva ao edema, contém uma variedade de mediadores, que influenciam as células na vizinhança e nos próprios vasos sanguíneos. Esses mediadores incluem os componentes de quatro cascatas enzimáticas proteolíticas: o sistema do complemento, o sistema da coagulação, o sistema fibrinolítico e o sistema das cininas (Rang e Dale, 2007).

A lesão tecidual também induz a formação dos eicosanóides (figura 26). Os eicosanóides estão implicados no controle de muitos processos fisiológicos, incluindo-se entre os mediadores e

moduladores mais importantes da reação inflamatória. A principal fonte dos eicosanóides é o ácido araquidônico (ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetraenóico), um ácido graxo insaturado de 20 carbonos contendo quatro duplas ligações. O ácido araquidônico é encontrado esterificado nos fosfolípidios. Os principais eicosanóides são as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos (Goodman e Gilman, 2005).

A fosfolipase A₂ (PLA₂) citosólica ou secretória, como no caso dos venenos botrópicos, hidrolisa a ligação éster *sn*-2 dos fosfolípidios de membrana (particularmente a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina) com liberação do araquidonato e lisoglicerol- fosforilcolina, precursora do fator de ativação plaquetária (PAF) que exerce os efeitos de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia. A etapa inicial, na produção dos eicosanóides consiste, portanto, na liberação do araquidonato pela fosfolipase A₂. Parte do araquidonato, uma vez liberado, é metabolizada em produtos oxigenados por sistemas enzimáticos como as ciclooxigenases (COX) e as lipooxigenases (LOX). Os produtos derivados da via da COX são a PGE₂, a PGI₂, PGD₂, a PGF₂ e o tromboxano A₂ (TXA₂), que constituem os prostanóides (Goodman e Gilman, 2005).

A resposta inflamatória é sempre acompanhada de liberação de prostanóides, cujo produto predominante é a PGE₂, embora a PGI₂ também possa ser encontrada. Nas áreas de inflamação aguda, a PGE₂ e a PGI₂ são produzidas pelos tecidos e vasos sanguíneos locais, enquanto os mastócitos liberam PGD₂. A PGE₂, a PGI₂ e a PGD₂ são poderosos vasodilatadores intrínsecos e atuam de modo sinérgico com outros vasodilatadores inflamatórios, como a histamina e a bradicinina. E essa ação dilatadora combinada sobre as arteríolas pré-capilares que contribui para o eritema e aumento do fluxo sanguíneo observados nas áreas de inflamação aguda. Esses prostanóides não aumentam diretamente a permeabilidade das vênulas pós-capilares, porém potencializam esse efeito da histamina e da bradicinina, contribuindo para a formação do edema, um dos efeitos farmacológicos estudados produzidos pela PLA₂ BrTX-I. O tromboxano A₂ (TXA₂), produto da cascata do ácido araquidônico iniciada pela ação da PLA₂ sobre os fosfolípidios de membrana, é responsável pela agregação plaquetária.

Os leucotrienos são produtos da via das lipooxigenases (LOX). Os leucotrienos C₄, D₄, E₄ (LTC₄, LTD₄, LTE₄) aumentam a permeabilidade capilar e o leucotrieno B₄ (LTB₄) é um poderoso agente quimiotático tanto para os neutrófilos quanto para os macrófagos. Nos neutrófilos, induz também a supra-regulação das moléculas de adesão da membrana e aumenta a produção de produtos tóxicos do oxigênio, bem como a liberação de enzimas granulares. Nos

macrófagos e nos linfócitos, estimula a proliferação e a liberação de citocinas. Desta forma fica clara a importância da PLA₂ na gênese dos eventos inflamatórios.

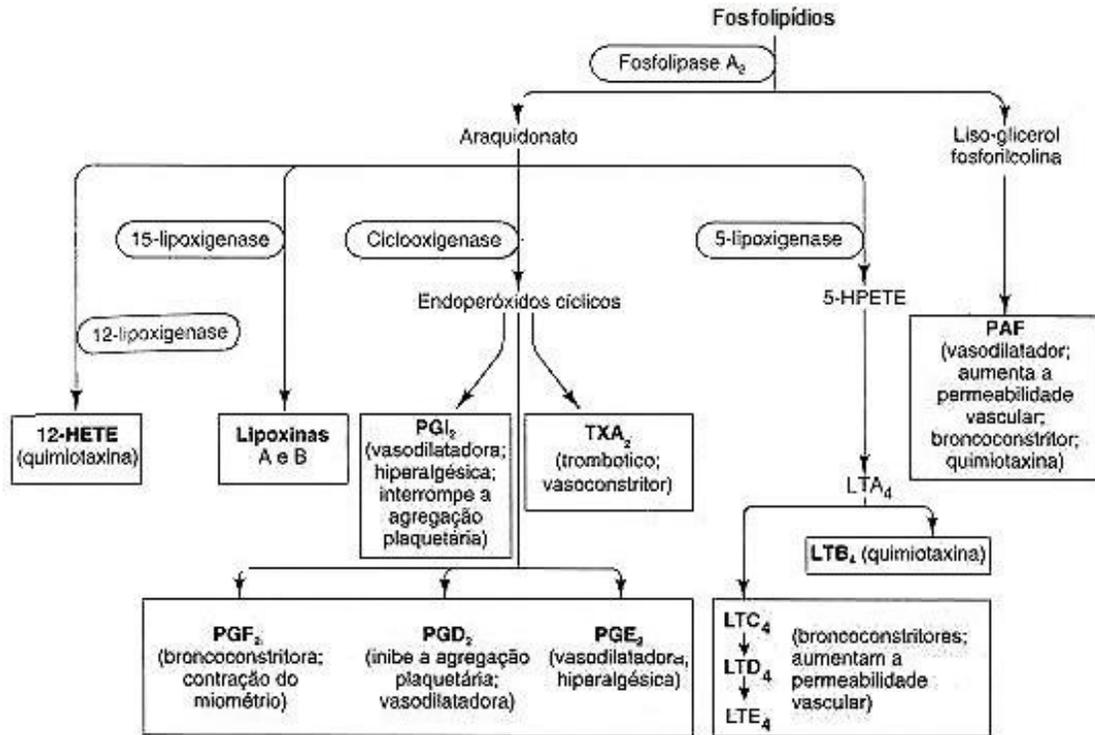


Figura 26. Cascata do ácido araquidônico e produção dos eicosanóides. PAF, fator de ativação plaquetária; PG, prostaglandina; PGI, prostaciclina; TX, tromboxano; LT, leucotrieno; HETE, ácido hidroxi-eicosatetraenóico; HPETE, ácido hidroperoxieicosatetraenóico. (Adaptado de Rang e Dale, 2007).

O veneno de serpentes da família Viperidae contém PLA₂ do grupo II as quais compartilham semelhanças estruturais com as PLA₂ secretórias do grupo II-A presentes em exudatos inflamatórios de mamíferos (Kaiser et al., 1990; Kini, 1997). Várias PLA₂ de veneno têm demonstrado capacidade de indução de edema *in vivo* (Vishwanath et al., 1987; Lomonte et al., 1992). Embora os mecanismos de ação destas PLA₂ nos eventos inflamatórios ainda sejam pouco conhecidos, sabe-se que a liberação do araquidonato pode também causar aumento dos níveis de tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos, os quais por sua vez, levam aos efeitos farmacológicos (Rosemberg, 1986).

Segundo Soares et al. (2000b), fosfolipases A₂ presentes em venenos ofídicos exercem grande variedade de efeitos farmacológicos, entre eles, uma importante atividade edematogênica.

Estas substâncias podem induzir edema por dois mecanismos distintos: através da liberação do ácido araquidônico em consequência da degradação enzimática da membrana fosfolipídica, atuando diretamente sobre os fosfolipídios de membrana ou indiretamente sobre glicoproteínas da membrana, ativando PLA₂ citosólicas cálcio-dependentes, aumentando a biossíntese de eicosanóides e diretamente, afetando a microvasculatura, levando a exsudação do plasma.

Estudos utilizando diferentes venenos ofídicos demonstram que o início do edema e o tempo necessário para que este alcance índices máximos variam consideravelmente (Selistre et al., 1996). Este fato poderia ser explicado por variações na composição e origem dos venenos, bem como por diferenças nas espécies de animais empregadas. Araújo et al. (2002) descreveram que o veneno de *B. lanceolatus*, quando inoculado na região intraplantar de camundongos, produz respostas edematizantes máximas somente 2 horas após a injeção, desaparecendo em 24 horas.

Estudos prévios relatam a infiltração celular de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares após administração de fosfolipases A₂ miotóxicas de venenos de *B. asper* (Lomonte et al., 1992), *B. nummifer* (Gutiérrez et al., 1986a) e *B. jararacussu* (Gutiérrez et al., 1991) em músculo esquelético de camundongo e após administração intrapleural de miotoxinas similares, obtidas dos venenos de *B. jararacussu* e *B. pirajai* (de Castro et al., 2000).

A análise da inflamação eliciada pela PLA₂ BrTX-I do veneno de *B. roedingeri* em camundongo, executada no presente estudo, possibilitou uma avaliação do aumento da permeabilidade microvascular, através do edema de pata e da produção de mediadores inflamatórios (citocinas).

O efeito edematogênico foi observado quando a PLA₂ BrTX-I foi inoculada na região intraplantar de patas de camundongos. O aumento da permeabilidade vascular detectado após a injeção das diferentes doses da BrTX-I, se desenvolveu rapidamente e com intensidades semelhantes, indicando que o extravasamento do plasma observado é primeiramente devido à formação de “gaps” no endotélio dos vasos da microcirculação. O edema de pata induzido ocorreu com intensidade similar nas doses testadas e atingiu índices máximos 2 horas após a injeção e índices estatisticamente insignificantes após 24 horas.

Tais fenômenos foram também observados com os venenos de *B. insularis* (Barbosa et al., 2003) e *B. jararacussu* (Ketelhut et al., 2003). O Fator de necrose tumoral TNF- α provavelmente está envolvido no processo de inflamação induzido pela BrTX-I, uma vez que a PLA₂ BrTX-I causou um significativo aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α . O TNF- α induz a expressão da

L-selectina e CD18, ativação da C5a e PECAM-1/ICAM-1 (moléculas de adesão intercelular) e desencadeou a liberação de citocinas tais como IL-1 e IL-6.

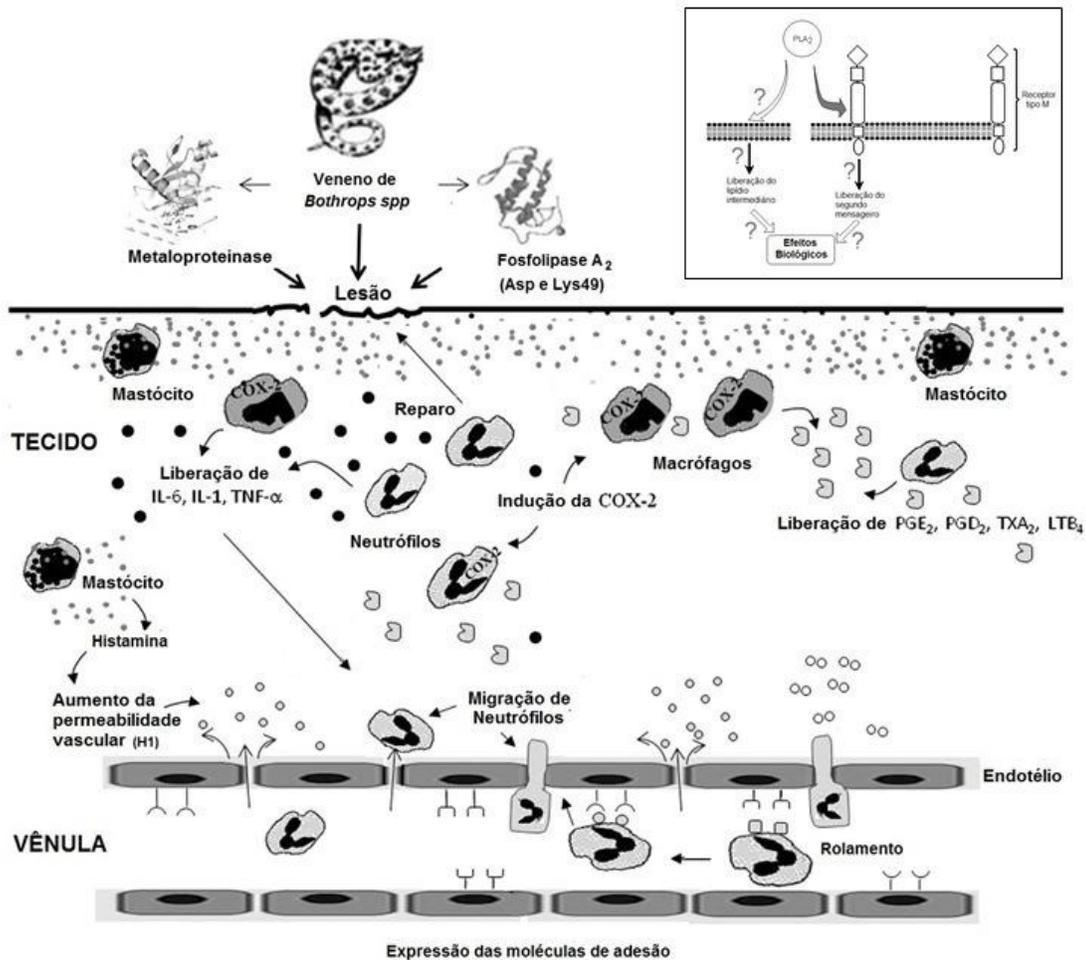


Figura 27. Representação esquemática parcial da ação inflamatória do veneno botrópico, da fosfolipase A₂ e da metaloproteinase, isoladas deste veneno. Após uma lesão tecidual, diversos mediadores são produzidos na circulação ou próximos à lesão pelas células endoteliais e residentes, principalmente mastócitos, macrófagos do tecido e células dendríticas. Neutrófilos circulantes migram para o local da lesão sob a influência de agentes quimiotáticos e transmigram para o tecido (diapedese). Todos os passos na cascata de recrutamento celular são regulados pelas moléculas de adesão celular. COX₂, ciclooxigenase₂; PGs, Prostaglandinas; TXA₂, tromboxano A₂; LTB₄, Leucotrieno B₄; H₁, receptor de histamina; IL-6, Interleucina 6; IL-1, Interleucina 1; TNF-α, Fator de necrose tumoral α. (Adaptado de Teixeira et al., 2009). Detalhe: Modos de ação da PLA₂ sobre a membrana.

Nossos resultados demonstraram que a BrTX-I induziu o aumento das IL-1 e IL-6 e do TNF-α no plasma, que de acordo com estudo de Stylianou e Saklatvala (1998), induzem a

expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais. A BrTX-I também estimulou da produção de edema, podendo este ser originado da ação da BrTX-I sobre a microvasculatura e/ou membranas celulares, liberando mediadores eicosanóides como as prostaglandinas e os leucotrienos que são vasodilatadores, aumentam a permeabilidade vascular e são potentes agentes quimiotáticos para leucócitos polimorfonucleares (Teixeira et al., 2009).

Estes resultados estão de acordo com os obtidos com os venenos de *B. asper* (Lomonte et al., 1992, Teixeira et al., 2009), *B. nummifer* (Gutiérrez et al., 1986a) e *B. jararacussu* (Gutiérrez et al., 1991) em músculo esquelético de camundongo e após administração intrapleural de miotoxinas similares, obtidas dos venenos de *B. jararacussu* e *B. pirajai* (de Castro et al., 2000). Deste modo, nossos resultados sugerem que o TNF- α atuou na expressão de CD18 e liberação de outras citocinas após a administração da BrTX-I, sendo assim relevante para o influxo de neutrófilos e aumento da permeabilidade vascular no edema de pata. Outras citocinas avaliadas, tais como IL-1 e IL-6 também são mediadores relevantes para a formação do edema e migração leucocitária e participam em diversas condições inflamatórias. A identificação de mediadores envolvidos na transição da inflamação induzida pelo veneno botrópico para a resolução é uma das principais questões a serem esclarecidas no futuro.

O estudo de toxinas isoladas tem sido uma abordagem inestimável para analisar minuciosamente os complexos eventos que levam ao desenvolvimento da inflamação induzida pelo veneno total. Fosfolipases A₂ purificadas a partir de veneno de serpentes podem ser largamente utilizadas como modelos biológicos para compreensão das respostas desencadeadas pela lesão tecidual e cascatas inflamatória e imunológica, visto que a resolução da inflamação e a fase de reparos envolvem o decaimento de mediadores pró-inflamatórios e o aumento de mediadores anti-inflamatórios (Serhan e Savill, 2005), mecanismos estes que requerem mais estudos para sua melhor compreensão.

Este trabalho descreveu a purificação e caracterização bioquímica e farmacológica de uma fosfolipase A₂ com atividades miotóxica, pró-inflamatória e uma potente atividade neurotóxica *ex vivo* pré-sináptica irreversível, ainda não descrita na literatura para o veneno estudado. Estes achados indicam uma modificação estrutural desta proteína na região dos resíduos de aminoácidos 80 a 110, (sítio neurotóxico pré-sináptico), apresentando uma atividade neurotóxica pré-sináptica diferenciada de outras PLA₂ com o mesmo tipo de atividade, mas por mecanismos diferentes, uma vez que não exhibe facilitação antes do bloqueio como a PLA₂ de *B. asper* (Montecucco e Rosseto, 2000), a crotóxina (Hawgood e Smith, 1989), a notexina (Su e Chang,

1984) e a PLA₂ de *B. insularis* (Cogo et al., 1998), mas ainda apresentando regiões altamente conservadas, confirmada pela presença da alça de ligação ao cálcio e do aminoácido aspartato na posição 49 da cadeia polipeptídica, com importante participação na estrutura tridimensional, responsável pela hidrólise de fosfolipídios e portanto, das ações farmacológicas exibidas, tais como atividade inflamatória, miotóxica e neurotóxica. Apesar da atividade catalítica da PLA₂ contribuir para os efeitos farmacológicos, ela não é um pré-requisito (Landucci et al., 1998; Andrião-Escarso et al., 2000). Desta forma, estudos posteriores serão necessários para identificar as determinantes estruturais envolvidas nestas atividades farmacológicas.

Perspectivas futuras

As PLA₂ presentes no veneno das serpentes são enzimas pequenas responsáveis por uma série de efeitos farmacológicos que alteram os processos fisiológicos normais da presa. Essas moléculas são um desafio aos químicos de proteínas, a fim de poder estabelecer as mais difíceis relações de estrutura-função. Uma discussão mais ampla contribuirá para a melhor compreensão das interações entre proteínas, para o desenvolvimento de novos carreadores moleculares altamente específicos. Estes estudos auxiliarão a estabelecer os mecanismos de ação dos efeitos farmacológicos nos níveis celular e molecular. No futuro os estudos nestas áreas podem produzir novas hipóteses, conforme as novas tecnologias sejam incorporadas à pesquisa, aumentando o conhecimento sobre a relação estrutura-função das biomoléculas e como utilizá-las na instrumentação da pesquisa e modelos para novas práticas médico-científicas.

6. CONCLUSÕES

De acordo com nossos resultados, concluímos que:

6.1 A metodologia utilizada no processo de purificação da BrTX-I a partir do veneno *B. roedingeri*, uma combinação de duas etapas cromatográficas distintas, demonstrou ser rápida e eficiente conservando as suas atividades biológicas, com um alto grau de pureza e homogeneidade molecular.

6.2 A análise da composição de aminoácidos mostrou que se trata de uma proteína de caráter básico. A determinação estrutural evidenciou um alto grau de homologia com outras PLA₂ de venenos procedentes de serpentes da família Viperidae.

6.3 A BrTX-I apresentou atividade enzimática máxima entre 35 e 40°C e pH 8,0. Na presença do substrato 4N3OBA, a PLA₂ mostrou um comportamento alostérico em baixas concentrações do substrato, evidenciando um mecanismo de cooperação mnemônica. A BrTX-I mostrou ser uma PLA₂ dependente do cálcio, tendo sua atividade diminuída na presença de outros cátions bivalentes.

6.4 Tanto o veneno total de *B. roedingeri* quanto a PLA₂ BrTX-I, apresentaram uma ação neurotóxica *ex vivo*, dose-dependente, na preparação biventer cervicis de pintainho. Além disso, foi mostrado que tanto o veneno quanto a PLA₂ possuem uma ação neurotóxica específica e irreversível em sítios pré-sinápticos, com mecanismo de ação diferente de outras PLA₂ neurotóxicas descritas na literatura, uma vez que não induz a uma facilitação das contrações musculares antes do bloqueio.

6.5 O aumento da concentração de creatina quinase (CK) no plasma de camundongos (*in vivo*), que ocorreu após a administração da BrTX-I pela via intramuscular e não pela via intravenosa, demonstrou o efeito miotóxico local inespecífico, dose-dependente e de duração transitória.

6.6 No teste da atividade edematogênica a porcentagem de edema atingiu níveis bastante expressivos com injeção da PLA₂ nas diferentes concentrações testadas. A PLA₂ BrTX-I causou

um aumento significativo nas concentrações de TNF- α , de IL-1 e IL-6 entre 1e 12 horas, tendo o TNF- α atingido o pico em 1 hora, a IL-1 em 6 horas e a IL-6 em 3 horas, mostrando a participação da BrTX-I nos eventos inflamatórios causados pelo veneno da serpente *B. roedingeri*, fenômeno observado com as PLA₂ dos venenos botrópicos em geral.

6.7 Como produto desta tese foi elaborado o artigo intitulado “Biochemical characterization and pharmacological properties of new basic PLA₂ Br TX-I isolated from *Bothrops roedingeri* snake venom (Roedinger's Lancehead) Mertens 1942” aceito pelo *Journal of Biomedicine and Biotechnology* para publicação na edição especial “Understanding the Molecular Mechanism and Structure-Function Relationship of the Toxicity of PLA₂ and K49 Homologs in Snake Venom” em janeiro de 2013.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, C.F.S., da Silva, O.A., Godoy, P., Miranda, D., 1985. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. *Toxicon* 23, 877-85.
- 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 A₂ in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie* 82, 755–763.
- Araújo, A.L., Donato, J.L., Leite, G., Prado-Franceschi, J., Fontana, M.D., Bon, C., Rodrigues-Simioni, L., 2002. Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom and a caseinolytic fraction. *Toxicon* 40, 1283.
- Arni, R.K., Ward, R.J., 1996. Phospholipase A2 - A structural review. *Toxicon* 34, 827 - 841.
- Azañero, M., Escobar, E., Yarleque, A., 2000. Purificación de una enzima proteolítica del veneno de *Bothrops roedingeri* y estudio de su actividad sobre fibrinógeno. *Ver. Peru. Biol.* 7.
- 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.
- Barbosa, A.M., do Amaral, R.O., Teixeira, C.F., Hyslop, S., Cogo, J.C., 2003. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon* 42, 515-23.
- Beghini, D.G., Toyama, M.H., Hyslop, S., Sodek, L.C., Novello, J.C., Marangoni S. 2000. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (Maracambóia) venom. *J Protein Chem.* 19, 679-84.
- Bonfim, V.L., Ponce-Soto, L.A., Novello, J.C., Marangoni, S., 2006 . Structural and functional properties of Cr 5, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Calloselasma rhodostoma*. *Protein J.* 25, 492-502.

- Bonfim, V.L., Toyama, M.H., Novello, J.C., Hyslop, S., Oliveira, C.R., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S., 2001. Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. *J. Protein Chem.* 20, 239-45.
- Bortoleto, R.K., Murakami, M.T., Watanabe, L., Soares, A.M., Arni, R.K., 2002. Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon* 40, 1307-12.
- Brazil, V., Pestana, R., 1909. Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico, *Rev.Med. de São Paulo* 19, 20 e 21.
- Breithaupt, H., 1976. Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A2 and the crotoxin complex. *Toxicon* 14, 221-33.
- Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009. Phospholipase A2 Biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther* 23, 49–59.
- Calgarotto, A.K., Damico, D.C., Ponce-Soto, L.A., Baldasso, P.A., Da Silva, S.L., Souza, G.H., Eberlin, M.N., Marangoni, S., 2008. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A2 BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 51, 1509–1519.
- Campbell, J., Lamar, W., 2004. *The Venomous Reptiles of Latin América*. Cornell University Press, Ithaca, NY, p. 425.
- Chang, C.C., Chen, T.F., Lee, C.Y., 1973. Studies of the presynaptic effect of β -bungarotoxin on neuromuscular transmission. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 184, 339- 345.
- Chang, C.C., Su, M.J., 1980. Mutual potentiation, at nerve terminals, between toxins from snake venoms which contain phospholipase A activity : β -bungarotoxin, crotoxin, taipoxin . *Toxicon* 18, 641-648.
- Chernomordik, L.V., Kozlov, M.M., Zimmerberg, J., 1995. Lipids in biological membrane fusion. *J. Membr. Biol.* 146, 1–14.

- Chernomordik, L.V., Leikina, E., Frolov, V., Bronk, P., Zimmerberg, J., 1997. An early stage of membrane fusion mediated by the low pH conformation of influenza hemagglutinin depends upon membrane lipids. *J. Cell Biol.* 136, 81–93.
- Cho, W., Kezdy, F.J., 1991. Chromogenic substrates and assay of phospholipases A₂. *Methods Enzymol.* 197, 75-79.
- Cintra, A.C., Marangoni, S., Oliveira, B., Giglio, J.R., 1993. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *J. Protein. Chem.* 12, 57-64.
- Cogo, J.C., Prado-Franceschi, J., Cruz-Höfling, M.A., Corrado, A.P., Rodrigues-Simioni, L., 1993. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. *Toxicon* 31, 1237-47.
- Cogo, J.C., Prado-Franceschi, J., Giglio, J.R., Corrado, A.P., Cruz-Hofling, M.A., Donato, J.L., Leite, G.B., Rodrigues-Simioni, L., 1998. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ fraction. *Toxicon* 36, 1323-32.
- Cornish-Bowden, A., Cardenas, M.L., 1987. Co-operativity in monomeric enzymes. *J.Theor. Biol* 124, 1-23.
- Costa, P.D., Toyama, M.H., Marangoni, S., Rodrigues-Simioni, L., Cruz-Hofling, M.A., 1999. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse *extensor digitorum longus* (EDL) muscle preparation. *Toxicon* 37, 1143-53.
- 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 A₂ isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1726: 75–86.
- de Castro, R.C., Landucci, E.C., Toyama, M.H., Giglio, J.R., Marangoni, S., de Nucci, G., Antunes, E., 2000. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A(2) into the rat pleural cavity. *Toxicon* 38, 1773-85.
- Deems, A.S., Dennis, E.A., 2000. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization *biochim. Biophys Acta* 1488, 1–19.

- Dennis, E.A., 1994. Diversity of groups types, regulation and function of phospholipase A2. J. Biol. Chem. 269, 13057–60.
- Dennis, E.A., 1997. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. Trends Biochem Sci. 22, 1-2.
- Dennis, E.A., 2000. Phospholipase A2 in Eicosanoid Generation. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 161, 33-S35.
- Díaz-Oreiro C, Gutiérrez JM. 1997 Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. Toxicon 35(2):241-52.
- Duften, M.C., Hider, R C.,1983. Classification of phospholipase A2 according to sequence . Evolutionary and pharmacological implications. Eur. J. Biochem. 137, 545-551 .
- Duften, M.C., Eaker, D., Hider, R.C., 1983. Conformational properties of phospholipase A₂. Secondary structure prediction, circular dichroism and relative interface hydrophobicity . Eur. J. Biochem. 137, 537-544.
- Durigon, A.M., Borja-Oliveira, C.R., Dal Belo, C.A., Oshima-Franco, Y, Cogo, J.C., Lapa A.J., Souccar, C., Rodrigues-Simioni, L., 2005. Neuromuscular activity of *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom in mouse nerve-muscle preparations. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis 11, *On-line version* ISSN 1678-9199.
- Ferreira, S.H., 2000. Angiotensin Converting Enzyme: History and Relevance. Sem Perinatology 24, 7-10.
- Fletcher, J.E., Hubert, M., Wieland, S.J., Gong, Q.H., Jiang, M.S., 1996. Similarities and difference in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. Toxicon 34, 1301 - 1311.
- Fontana, M.D., Heleno, M.G., Vital Brazil, O., 1996. Mode of action of Duvernoy's gland extracts from the colubrid *Dryadophis bifossatus* in the chick *biventer cervicis* nerve-muscle preparation. Toxicon 34, 1187-1190.

- Francis, B., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Kaiser, I.I., 1991. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine 49 phospholipase A₂. Arch. Biochem. Biophys. 284, 352 - 359.
- Fundação Nacional de Saúde, 2001. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª ed. Brasília– FUNASA, Ministério da Saúde.
- Gallacci, M., Cavalcante, L.M.G., 2010. Understanding the *in vitro* neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologues. Toxicon 55, 1-11.
- Garcia-Leme, J., Hammamura, L., Leite, M.P., Rocha e Silva, M., 1973. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating. Br. J. Pharmacol. 48, 88–96.
- Geoghegan, P., Ângulo, Y., Cangelosi, A., Díaz, M., Lomonte, B., 1999. Characterization of a basic phospholipase A₂-homologue myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops neuwiedii* (yará chica) from Argentina. Toxicon 37, 1735-46.
- Ginsborg, B.L., Warriner, J.N., 1960. The isolated chick *biventer cervicis* nerve-muscle preparation. Br. J. Pharmacol. 15, 410-411.
- Goodman e Gilman, 2005. As bases farmacológicas da terapêutica. 10ª ed. Rio de Janeiro, Editora McGraw-Hill, 1647pp.
- Gopalakrishnakone, P.; Hawgood, B.J., 1984. Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. Toxicon 22, 791-804.
- Granger, D.N., Kubes, P., 1994. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. J. Leukoc. Biol. 55, 662–675.
- Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., 1995. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Toxicon 33, 1405 - 1424.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 1997. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini, R.M. (Ed.), Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism. Wiley, Chichester, England, 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.; Lomonte, B.; Cerdas, L. (1986) Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. *Toxicon* 24 (9): 885-94.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Chavez, F.E., Cerdas, L., 1986b. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of snake *Bothrops asper*. *Comp. Biochem. Physiol.* 84C, 159 – 164.
- Gutiérrez, J.M., Nuñez, J., Díaz, C., Cintra, A.C., Homs-Brandeburgo, M.I., Giglio, J.R., 1991. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp Mol Pathol.* 55, 217-29.
- Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L., 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42, 915–931.
- Gutiérrez, J.M., Ponce-Soto, L.A., Marangoni, S., Lomonte, B., 2008. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A(2): Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA(2) homologue. *Toxicon* 51, 80-92.
- Gutiérrez, J.M., Williams, D., Fan, H.W., Warrell, D.A., 2010. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon* 56, 1223-35.
- Guyton, A. C., 2006. *Tratado de Fisiologia Médica*, 11ª ed. Rio de Janeiro. Editora Elsevier. 1115 pp.
- Harris, J.B., 1991. Phospholipases in snake venoms and their effect on the nerve and muscle, In: *Snake Toxins*, Harvey, A.L. (ed), 91 - 129, Pergamom Press, Inc. New York.
- Harvey, A.L., Barfaraz, A., Thompson, E., Faiz, A., Preston, S., Harris, J.B., 1994. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. *Toxicon* 32, 257-265.

- Harvey, A.L., Bradley, K.N., Cochran, S.A., Rowan, E.G., Pratt, J.A., Quillfeldt, J.A., Jerusalinsky, D.A., 1998. What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon* 36, 1635-1640.
- Harvey, A.J., Robertson, B., 2004. Dendrotoxins: structure-activity relationships and effects on potassium ion channels. *Curr. Med. Chem.* 11, 3065-3072.
- Hawgood, B.J., Smith, I.C.H., 1989. The importance of phospholipase A₂ in the early induction by crotoxin of biphasic changes in end plate potentials at the frog neuromuscular junction. *Toxicon* 27, 272-6.
- Heluany, N.F., Homsí-Brandeburgo, M.I., Giglio, J.R., Prado-Franceschi, J., Rodrigues-Simioni, L., 1992. Effects induced by Bothropstoxin a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. *Toxicon* 30, 1203-1210.
- Heinrikson, R.L., Meredith, S.C., 1984. Amino acid analysis by reverse phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylthiocyanate. *Analytical Biochemistry* 13, 65-72.
- Hodgson 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 A₂. *Toxicon* 34, 1149-1155.
- Homsí-Brandeburgo, M.I., Queiroz, L.S., Santo Neto, H., Rodrigues-Simioni, L., Giglio, J. R., 1988. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial Chemical Characterization and Biological Activity of Bothropstoxin. *Toxicon* 26, 615 - 627.
- Huancahuire-Vega, S., Ponce-Soto, L.A., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S., 2009. Structural and functional characterization of brazilitoxins II and III (BbTX-II and -III), two myotoxins from the venom of *Bothrops brazili* snake. *Toxicon* 54, 818-27.
- Hubbard, A., Rothlein, R., 2000. Intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1379–1386.

- Isla, M., Málaga, O., Yarleque, A., 2003. Características Bioquímicas y Acción Biológica de una hemorragia del veneno de *Bothrops roedingeri*. Anales da Faca. Mes. UNMSM 156, 166.
- Jimenez-Porras, J.M., 1973. Reptile toxins. In: Biology Data Book, 2nd ed, Vol. II, 697. Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), Bethesda, MD., U.S.A.
- Kaiser, I.I., Gutiérrez, J.M., Plummer, D., Aird, S.D., Odell, G.V., 1990. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. Arch. Biochem. Biophys 278, 319–325.
- 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.
- Kaplanski, G., Marin, V., Montero-Julian, F., Mantovani, A., Farnarier, C., 2003. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. Trends Immunol. 24, 25–29.
- Karlsson, E., 1979. Chemistry of protein toxic in snake venom. In Lee, C.Y. (Ed): Handbook of Experimental Pharmacology 159-212. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Ketelhut, D.F., de Mello, M.H., Veronese, E.L., Esmeraldino, L.E., Murakami, M.T., Arni, R.K., Giglio, J.R., Cintra, A.C., Sampaio, S.V., 2003. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A2 isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. Biochimie 85, 983-91.
- Kini, R.M., 1997. Phospholipase A2: a complex multifunctional protein puzzle. In: R. M. Kini (Ed), Venom Phospholipase A2 enzymes: Structure, Function and Mechanism, Wiley, Chichester, 1-28.
- Kini, R.M., 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. Toxicon 42, 827-840.
- Kini, R.M., Evans, H.J., 1987. Structure Function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipase A2. J. Biol. Chem. 262, 14402 - 14407.

- Kini, R.M., Evans, H.J., 1989a. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* 27, 613–635.
- Kini, R.M., Evans, H.J., 1989b. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. *Int. J. Peptide Protein Res.* 34, 277–286.
- Kini, R.M., Evans, H.J., 1989c. Role of cationic amino acid residues in cytolytic activity. Modifications of lysine residues in the cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom and correlation between cytolytic and antiplatelet activities. *Biochemistry* 28, 9209–9215.
- Kini, R.M. Iwanaga, S., 1986. Structure function relationship of phospholipase II charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phosphodiesterase. *Toxicon* 24, 895-905.
- Kini, R.M., Iwanaga, S., 1986a. Structure-function relationships of phospholipases-I: prediction of presynaptic neurotoxicity. *Toxicon* 24, 527-541.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Landucci, E.C., Castro, R.C., Pereira, M.F., Cintra, A.C., Giglio, J.R., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., Antunes, E., Nucci, G., 1998. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur J Pharmacol.* 343,. 257–263.
- Lerma, L., Sandoval, G., Inga, R., Muñoz, M., Cavero, E., Yarlequé, A., 2004. Análisis cromatográfico del contenido enzimático del veneno de tres serpientes peruanas. *Rev. Arnaldoa* v.11 n.2 Trujillo ene./dic.
- Lewis, R.L., Gutmann, L., 2004. Snake venoms and the neuromuscular junction. *Sem. Neurol.* 24, 175-179.
- Lin-Shiau, S.Y., Chen, C.C., 1982. Effects of beta-bungarotoxin and phospholipase A₂ from *Naja naja atra* snake venom on ATPase activities of synaptic membranes from rat cerebral cortex. *Toxicon* 20, 409-17.

- Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Ramírez, M., Díaz, C., 1992. Neutralization of myotoxic phospholipases A2 from the venom of the snake *Bothrops asper* by monoclonal antibodies. *Toxicon* 30, 239–245.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón, L., 2003. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 42, 885–901.
- Maraganore, J. M., Merutka, G., Cho, W., Welches, W., Kézdy, F. J., Heinrickson, R. L., 1984. A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *J. Biol. Chem.* 259, 13839–43.
- Markland, F., 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36, 1749-1800.
- Mebs, D., Ownby, C. L., 1990. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmacol. Ther.* 48, 223-236.
- Montecucco, C., Rossetto, O., 2000. How do presynaptic PLA₂ neurotoxins block nerve terminal. *Trends Biochem. Sci.* 25, 266-270.
- Monterrey, F., 2001. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias, UCV, Caracas, Venezuela.
- Nakai, M., Nakashima, K.I., Ogawa, T., Shimohigashi, Y., Hattori, S., Chang, C.C., Ohno, M., 1995. Purification and primary structure of a myotoxic lysine 49 phospholipase A2 with low lipolytic activity from *Trimeresurus gramineus* venom. *Toxicon* 33, 1469-78.
- Ownby, C.L., Selistre-de-Araujo, H. S., White, S.P., Fletcher, J.E., 1999. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. *Toxicon*, 37, 411–445.
- Pantigoso, C., Escobar, E., Yarleque, A., 2001. Aislamiento y caracterización de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops roedingeri*, Hoge, 1953 (ophidia: viperidae) *Rev. Per. Biol.* 8.
- Pantigoso, C., Escobar, E., Yarleque, A., 2002. Acción de la miotoxina de *Bothrops roedingeri* Hoge, 1953 (Ophidia: Viperidae) *Rev. Per. Biol.* 9, 74-83.

- Ponce-Soto, L.A., Baldasso, P.A., Romero-Vargas, F.F., Winck, F.V., Novello, J.C., Marangoni, S., 2007b. Biochemical, Pharmacological and Structural Characterization of Two PLA(2) Isoforms Cdr-12 and Cdr-13 from *Crotalus durissus ruruima* Snake Venom. *Protein J.* 26, 39-49.
- Ponce-Soto, L.A., Bonfim, V.L., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J.C., Marangoni, S., 2006. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA₂ D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using *in vitro* neuromuscular preparations, S. *The Protein Journal* 25, 147-55.
- Ponce-Soto, L.A., Lomonte, B., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J.C., Marangoni, S., 2007a. Biological and Structural Characterization of Crotoxin and New Isoform of Crotoxin B PLA(2) (F6a) from *Crotalus durissus collilineatus* Snake Venom. *Protein J.* 26, 221-230.
- Ponce-Soto, L.A., Marangoni, S., Hernandez, S.S., Dal Belo, C.A., Corrado, A.P., Rodrigues-Simioni, L., 2009. Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA(2) isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology and Pharmacology* 150, 291-297.
- Ponce-Soto, L.A., Martins, D., Novello, J.C., Marangoni, S., 2007. Structural and biological characterization of two crotoxin isoforms IV-2 and IV-3 isolated from the *Crotalus durissus cumananensis* venom. *The Protein Journal* 26, 533-540.
- Ponce-soto, L.A., Martins, D., Marangoni, S., 2010. Neurotoxic, myotoxic and cytolytic activities of the new basic PLA₂ 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 PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *J Protein Chem.* 21,131-6.
- Prado-Franceschi, J., Hyslop, S., Cogo, J.C., Andrade, A.L., Assakura, M.T., Reichl, A.P., Cruz-Höfling M.A., Rodrigues-Simioni, L., 1998. Characterization of a myotoxin from the Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* (green snake): effects on striated muscle and the neuromuscular junction. *Toxicon* 36,1407-2.

- Rang and Dale, 2007. Farmacologia. 6^a ed. Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 830pp.
- Ribeiro, L.A., Albuquerque, M.J., de Campos, V.A., Katz, G., Takaoka, N.Y., Lebrao, M.L., Jorge, M.T., 1998. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. Rev. Assoc Med Bras 44, 312-8.
- Rigden, D.J., Jedrzejas, M.J., Galperin, M.Y., 2003. An extracellular calcium-binding domain in bacteria with a distant relationship to EF-hands. FEMS Microbiol Lett. 22, 103-110.
- Rodrigues-Simioni, L.; Borges, N., Ceccarelli, B., 1983. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. Neuroscience 10, 475-489.
- Rodrigues-Simioni, L., Zamunér, S.R., Cogo, J.C., Borja-Oliveira, C.R., Prado-Franceschi, J., Cruz-Höfling, M.A., Corrado, A.P., 2004. Pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). Toxicon 43, 633-638.
- Rodriguez-Acosta, A., 2001. <http://caibo.ucv.ve/vitaenueve/articulos/medicinatropical/archivosPDF>.
- 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.
- Rosenberg, P., 1986. The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons. In: Harris, J.B., (Ed.), Natural Toxins, Oxford University Press, Oxford, pp. 129–174.
- Rosenberg, P., 1990. Phospholipases. In: Shier, W.T., Mebs, D. (Eds). Handbook of Toxinology. New York :Marcel dekker, 67-227.
- Rosenfeld, G., 1971. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: (Bucherl, W. and Buckley, E.E., ed). Venomous Animals and their Venoms, New York, Academic Press, pp. 345-384, Vol. 2.

- Rotchild, A. M., Rotchild, Z., 1979. Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: Lee, C. Y (Ed). Snake Venoms. New York: Springer Verlag, 541.
- Ryan, G.B., Majno, G., 1977. Antiinflammation. A review. Am. J. Pathol. 86, 183–276.
- Scott, D. L., White, S. P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M. H., Sigler, P. B., 1990. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. Science 250, 1541-1546.
- Scott, D.L., Sigler, P.B., 1994. Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A2. Adv Protein Chem 45, 53-88.
- Selistre, H.S., White, S.P., Ownby, C.L., 1996. Sequence analysis of Lys 49 phospholipase A2 myotoxins: a highly conserved class of protein. Toxicon 34, 1237 - 1242.
- Serhan, C.N., Savill, J., 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. Nat. Immunol. 6, 1191–1197.
- Six, D.A., Dennis, E.A., 2000. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. Biochim. Biophys. Acta 1488, 1-19.
- Soares, A.M., Andrião-Escarso, S.H., Ângulo, 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 A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. Arch. Biochem. Biophys. 373, 7 – 15.
- Soares, A.M., Guerra, S., Borja-Oliveira, C.R., Rodrigues, V.M., Rodrigues-Simioni, L., Rodrigues, V., Fontes, M.R., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R., 2000b. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi* pauloensis venom. Arch Biochem Biophys 15, 201-209.
- Stylianou, E., Saklatvala, J., 1998. Interleukin-1. Int J Biochem Cell Biol. 30, 1075-9.
- Su, M.J., Chang, C.C., 1984. Presynaptic effect of snake venom toxins which have phospholipase A2 activity (β -bungarotoxin, taipoxin, crotoxin). Toxicon 22, 631-640.
- Teixeira, C.F., Landucci, E.C., Antunes, E., Chacur, M., Cury, Y., 2003. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. Toxicon 42, 947-62.

- Teixeira, C., Cury, Y., Moreira, V., Picolo, G., Chaves, F., 2009. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon* 54, 988-997.
- Toyama, M.H., Mancuso, L.C., Giglio, J.R., Novello, J.C., Oliveira, B., Marangoni, S., 1995. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-I and II, two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom. N-terminal sequencing. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37, 1047– 1055.
- Tsai, I.H., Liu, H.C., Chang, T., 1987. Toxicity domain in presynaptically toxic phospholipase A₂ of snake venom. *Biochim. biophys. Acta* 916, 94-99.
- Tsai, I.H., Chen, Y.H., Wang, Y.M., Liao, M.Y., Lu, P.J., 2001. Differential expression and geographic variation of the venom phospholipases A₂ of *Calloselasma rhodostoma* and *Trimeresurus mucrosquamatus*. *Arch Biochem Biophys* 387, 257-64.
- Tu, A.T., 1991. Handbook of natural toxins, vol.5. Peptide venoms and toxins. Marcel Dekker, New York, NY, 827.
- Tzeng, M.C., Hseu, M.J., Yang, J.H., Guillory, R.J., 1986. Specific binding of three neurotoxins with phospholipase A₂ activity to synaptosomal membrane preparations from the guinea pig brain. *J. Protein Chem.* 5, 221–228.
- Valentin, E., Lambeau, G., 2000. What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂? *Biochimie* 82, 815–831.
- van den Bergh, C.J., Slotboom, A.J., Verheij, H.M., de Haas, G.H., 1988. The role of aspartic acid-49 in the active site of phospholipase A₂. A site-specific mutagenesis study of porcine pancreatic phospholipase A₂ and the rationale of the enzymatic activity of [lysine49] phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* venom. *Eur J Biochem.* 176, 353-7.
- Verheij, H.M., Vowerk, J.J., Jasen, E.H.J.M., Puyk, W.C., Dýkstra, B.W., Drenth, J., Hass, G. H., 1980. Methylation of Histidine - 48 in pancreatic phospholipase A₂, role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry* 19, 743-748.
- Vishwanath, B.S., Kini, R.M., Gowda, T.V., 1987. Characterization of three edema inducing phospholipase A₂ enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with an alkaloid, aristalochic acid. *Toxicon* 25, 501–515.

- Xiuxia, L., Jiashu, C., Yingna, Z., Pengxin, Q., Guangmei Y., 2002. Purification and biochemical characterization of factor II(a), a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom. *Toxicon* 39, 1133-39.
- Yang, C.C., 1994. Structure-function relationship of phospholipase A2 from snake venoms. *J.Toxicol.* 13, 125-177.
- Zavaleta, A., Salas, M., 1996. Ofidismo: envenenamiento por mordedura de serpientes. In: Martínez-Villaverde, J.R., León-Barúa, R., Vidal-Neira, L., Losno-García, R. (Eds.) *Emergencias en Medicina Interna*. Lima, Perú: 241– 260.

8. ANEXO



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

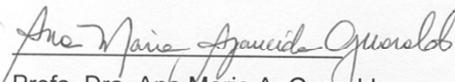
Certificamos que o Protocolo nº **2006-1**, sobre **Estudo ex vivo dos mecanismos de ação de neurotoxinas isoladas a partir da peçonha da serpente *Bothrops roedingeri***, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Sérgio Marangoni / Maurício Aurélio Gomes Heleno**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **09 de novembro de 2009**.

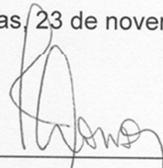
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2006-1**, entitled **Ex vivo study of the action mechanisms of neurotoxins isolated from venom of the snake *Bothrops roedingeri***", 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 **November 9, 2009**.

Campinas, 23 de novembro de 2010.

2ª. VIA


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva