

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Paula Rubya de Souza Câmara

“ Participação de neurônios sensoriais no aumento da permeabilidade microvascular em ratos induzido por PLA₂(s) e crotapotinas isoladas de Crotalus ”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
PAULA RUBYA DE SOUZA CÂMARA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE
BIOLOGIA PARA A OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA
FUNCIONAL E MOLECULAR NA ÁREA
DE CONCENTRAÇÃO EM BIOQUÍMICA.

Sergio Marangoni

Orientador: **Prof. Dr. Sergio Marangoni**

2002

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Nº CHAMADA		UNICAMP
		C14p
V	EX	
TOMBO BC/	51831	
PROC.	16-837-02	
C	☐	D ☒
PREÇO	R\$ 11,00	
DATA	16/12/02	
Nº CPD		

CM00177081-9

BIB ID 272481

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

C14p

Câmara, Paula Rubya de Souza

Participação de neurônios sensoriais no aumento da permeabilidade microvascular em ratos induzido por PLA₂(s) e crotapotinas isoladas de crotalus/Paula Rubya de Souza Câmara. --
Campinas, SP:[s.n.], 2002

ORIENTADOR: SÉRGIO MARANGONI

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

I.Crotalus. 2.Crotoxina. 3.Inflamação. 4. Neurônios. I. Marangoni, Sérgio. II.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 12 de julho de 2002.

BANCA EXAMINADORA:

PROF. DR. SERGIO MARANGONI (ORIENTADOR)

PROFA. DRA. IVANI APARECIDA DE SOUZA (FCM-UNICAMP)

PROFA. DRA. FERNANDA RAMOS GADELHA (IB-UNICAMP)

PROF. DR. MARCOS HIKARI TOYAMA (IB-UNICAMP)

Sergio Marangoni
Ivani Aparecida de Souza
Fernanda R Gadelha

4885000

A Deus.....

Pois apesar de estar distante de minha família, ele nunca me deixou sentir solidão e por deveras vezes senti a sua presença sobre mim, sempre me dando forças para sorrir e tomar as decisões certas, mesmo quando o coração se sentia angustiado.

Por ter colocado pessoas boas no meu caminho as quais me ajudaram e se tornaram minhas amigas.

Por ter-me ensinado a respeitar o próximo e a lhe auxiliar sempre que preciso fosse, honrando o juramento que fiz ao me formar e vivendo em paz com a minha consciência .

Muito obrigada meu Deus por tudo o que fizestes na minha vida e que eu sei que sempre o farás.

O Amor é o Dom Supremo

Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.

O amor jamais acaba; mas, havendo profecias, desaparecerão; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, passará.

Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três; porém o maior destes é o amor.

Coríntios 1, cap13, vers.2,8,13.

Agradecimentos

Aos meus familiares e amigos.....

Aos meus pais Maria Assis e Paulo Câmara, aos quais não existem palavras para agradecer e sim, buscar respeitá-los onde quer que eu esteja, fazendo com que continuem tendo sempre muito orgulho de mim;

Aos meus irmãos e cunhadas Paulo Henrique e Iris, Francisco Eduardo e Karine e Edson Hugo e Shenian que da forma deles, sempre torceram por mim;

Ao Iguatemi Eduardo, por ter-me dado o carinho e a força que necessitei para enfrentar muitos obstáculos;

Aos meus amigos, tios e primos que sempre torceram por mim e.....

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Sergio Marangoni que me acolheu no seu grupo de trabalho;

Ao Prof. Dr. Edson Antunes por ter-me permitido o acesso ao Dep. de Farmacologia da FCM e pelas suas imprescindíveis orientações que deram um sentido na minha pesquisa e na minha vida;

Aos Prof. Dr. José Camilo Novello, Profa. Dra. Ivani Aparecida de Souza e Prof. Dr. Tomomasa Yano pelas suas participações na minha banca de qualificação, simpatia e disponibilidade em ajudar;

Ao Dr. Marcos Hikari Toyama que pacientemente me orientou no LAQUIP, dando-me a visão do mundo científico;

À Dra. Elen T. Landucci pela sua cordialidade e receptibilidade;

Aos Prof. Dr. Geraldo Vicentini e Prof. Dr. Klaus Zinner do Instituto de Química da USP que me iniciaram no campo científico e me deram muito incentivo para eu vir fazer o meu mestrado em São Paulo;

Aos amigos Érika Marinho , Juan Chavez e Vanusa Aparecida que sempre me ajudaram muito desde a minha iniciação científica;

Aos amigos Carla Fernanda, Cristiane Freitas, Enilton Camargo, Laura Cristina, Luis Ponce, Paulo Baldasso e Silvana Pando que por deveras vezes, me socorreram nos meus mais difíceis momentos de aprendiz;

Às simpáticas e prestativas Andréa e Marina da secretaria pela atenção e dedicação sempre oferecidas;

Aos amigos dos Deptos de Bioquímica (Adriana, Ana Paula, Camila, Danielas Beghini, Carvalho e Damico, Dulce, Glaucia, José Antônio , Juliana, Luzia, Marino, Mirela e Verinha) e de Farmacologia (Alessandra, Alice, Cleber, Fernanda, Marta, Juliano, Lúcia, Nick , Sara, Sisi, Simone, Tathiane e Renata) que sempre me receberam com sorrisos fazendo com que os problemas se tornassem mais amenos;

À CAPES, por ter patrocinado este meu projeto de pesquisa e minha estada nesta instituição;

Por fim, mas não menos importante, À UNICAMP que me acolheu fazendo-me parte do seu corpo discente.

Lista de Materiais	ix
Lista de Acrônimos	x
Índice de Figuras	xii
Resumo	xiv
Abstract	xv
 CAPÍTULO 1. Introdução	 01
1.1 Inflamação	10
1.1.1 Mediadores vasoativos	11
1.1.2 Mediadores quimiotáticos	11
1.1.3 Mediadores enzimáticos	11
1.1.4 Proteoglicanas	11
1.2 Inflamação neurogênica	12
1.3 Agonistas e antagonistas de receptores de taquicininas	14
1.4 Papel das isoformas na inflamação neurogênica experimental	15
 OBJETIVOS	 17
 CAPÍTULO 2 – Materiais e Métodos	 18
2.1 Purificação e caracterização bioquímica	19
2.1.1 Procedência dos Materiais utilizados	19
2.1.2 Purificação e caracterização das PLA ₂ e crotapotinas procedentes do veneno total de <i>C.d.terrificus</i> , <i>C.d.collilineatus</i> e <i>C.d.cascavella</i>	19
2.1.3 Cromatografia de exclusão molecular dos venenos brutos de <i>C.d.terrificus</i> , <i>C.d.collilineatus</i> e <i>C.d.cascavella</i>	21
2.1.4 Cromatografia em HPLC de fase reversa dos venenos brutos de <i>C.d.terrificus</i> , <i>C.d.collilineatus</i> e <i>C.d.cascavella</i>	21
2.1.5 Eletroforese em gel PAGE-SDS-Tricina (16,5%) das amostras do veneno total, crotapotinas e PLA ₂ de <i>C.d.terrificus</i> , <i>C.d.collilineatus</i> e <i>C.d.Cascavella</i>	21
2.2 Testes Farmacológicos	22
2.2.1 Procedência dos animais utilizados	23
2.2.2 Determinação do aumento da permeabilidade microvascular cutânea em pele dorsal de ratos	23
2.2.3 Tratamentos	24
2.2.4 Análise estatística	24

CAPÍTULO 3 – Resultados	25
3.1 Purificação das isoformas	26
3.2 Efeito da injeção intradérmica das CA e PLA ₂ de <i>C.d.terrificus</i> , <i>C.d.collilineatus</i> e <i>C.d.cascavella</i> em pele dorsal de rato	30
3.3 Papel dos mastócitos nas respostas induzidas pelas crotopotinas e PLA ₂ de <i>Cd.terrificus</i> , <i>C.d.collilineatus</i> e <i>C.d.cascavella in vivo</i>	30
3.4 Efeito de antagonistas de receptores NK ₁ de taquicinas	31
3.5 Efeito do tratamento neonatal com capsaicina	31
 CAPÍTULO 4- Discussão	 41
4.1 Purificação e caracterização bioquímica	42
4.2 Atividade Farmacológica	44
 CAPÍTULO 5- Conclusão	 51
Referências Bibliográficas	53
APÊNDICES	67
APÊNDICE 1-Produção científica	68
APÊNDICE 2-Comité de ética	69

Lista de Materiais

Substâncias

Procedência

-Acetonitrila	Mallinckrodt
-Albumina Bovina Marcada I ¹²⁵	IPEN(USP, São Paulo, Brasil) e ICN
-Azul de Evans	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
-Bicarbonato de Amônio	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
-Capsaicina	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
-Cloridrato-Z-hidratado de Cálcio	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
-Ciproheptadina	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
-Composto C48/80	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
-Ditiotreitol	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
-Ácido Etilenodiaminotetrácetico	Cinética Química
-Guanidine HCl	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
-Halotano	Cristália Pr. Quí. e Farm.(Itapira, SP)
-Heparina	Roche
-Ácido Iodo Acético	Fluka
-Pentobarbital Sódico (Hypnol);	Rhone Merieux (Irlanda)
-SR 140333	Sanofi Synthe. (Montpellier,França)
-Substância P	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
-ÁcidoTrifluoroacetico	Aldrich
-Trizma Base	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
-Tween20-Polioxileno Sorbitano Monolaurato	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
-NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
-Salina	Frenesius (Campinas, SP)

Lista de Acrônimos

-A₂₂₀	Absorbância em 220nm
-A₂₈₀	Absorbância em 280nm
-AMBIC	Bicarbonato de Amônio
-C18	18 High Carbon Load,
-CA	Crotafetina
-C.d.cascavella	<i>Crotalus durissus cascavella</i>
-C.d.collilineatus	<i>Crotalus durissus collilineatus</i>
-C.d.terrificus	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
-Crtx	Crotoquina
-DTT	Ditiotreitól
-E.D.T.A	Ácido Etilenediaminotetracético
-FPLC	Cromatografia Líquida de Baixa Eficiência
-i.d.	intradérmico
-i.p.	intraperitoneal
-i.v.	intravenoso
-Kda	Kilo dalton
-LC	Sistema cromatográfico HPLC de purificação de proteínas biocompatível Waters, similar ao sistema FPLC da Pharmacia
-mono Q	Coluna de troca de ânion (Amônio quaternário)
-mono S	Coluna de troca de cátion (Sulfato de Metila)
-ì g (micro)	Fator de multiplicação 10 ⁻⁰⁶
-n (nano)	Fator de multiplicação 10 ⁻⁹
-p (pico)	Fator de multiplicação 10 ⁻¹²

-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
-PEG	Polietilenoglicol
-PLA₂	fosfolipase A ₂
-sPLA₂	fosfolipase A ₂ secretada
-rpm	rotações por minuto
-SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
-SP	Substância P (neuropeptídio)
-TFA	Ácido Trifluoroacético
-Tris	Trizma Base
-VT	Veneno Total
-Tampão A	T.F.A. 0,1%, pH 3,5
-Tampão B	Acetonitrila 66%

Índice de Figuras

Figura 1.1	Árvore filogenética da família das PLA ₂ s	08
Figura 2.1	Esquema da purificação e caracterização das frações PLA ₂ e crotapotinas crotálicas.	20
Figura 2.2	Esquema dos ensaios farmacológicos para a determinação do extravasamento plasmático evocado pelas crotapotinas e PLA ₂ crotálicas	22
Figura 3.1	Cromatografia de exclusão molecular dos venenos de <i>C.d.terrificus</i> , <i>C.d.collilineatus</i> e <i>C.d.cascavella</i> .	27
Figura 3.2	Perfil cromatográfico em HPLC de fase reversa das crotoxinas de <i>C.d.terrificus</i> , <i>C.d.collilineatus</i> e <i>C.d.cascavella</i>	28
Figura 3.3	Eletroforese em PAGE-SDS-Tricina dos venenos totais de <i>C.d.terrificus</i> , <i>C.d.collilineatus</i> e <i>C.d.cascavella</i> .	29
Figura 3.4	Extravasamento protéico induzido pela injeção i.d. das CA de <i>C.d.terrificus</i> , <i>C.d.collilineatus</i> e <i>C.d.cascavella</i> em pele dorsal de ratos	32
Figura 3.5	Extravasamento protéico induzido pela injeção i.d. das PLA ₂ de <i>C.d.terrificus</i> , <i>C.d.collilineatus</i> e <i>C.d.cascavella</i> em pele dorsal de ratos	33
Figura 3.6	Efeito do tratamento com ciproheptadina (2 mg/kg; i.p.) em ratos no edema induzido por CA e PLA ₂ do veneno de <i>C.d.terrificus</i> .	34
Figura 3.7	Efeito do tratamento com ciproheptadina (2 mg/kg; i.p.) em ratos no edema induzido por CA e PLA ₂ do veneno de <i>C.d.collilineatus</i> .	35
Figura 3.8	Efeito do tratamento com ciproheptadina (2 mg/kg; i.p.) em ratos no edema induzido por CA e PLA ₂ do veneno de <i>C.d.cascavella</i> .	36
Figura 3.9	Efeito do tratamento neonatal com capsaicina (50 mg/Kg; i.d.) em ratos no edema induzido por CA e PLA ₂ do veneno de <i>C.d.terrificus</i>	37
Figura 3.10	Efeito do tratamento neonatal com capsaicina (50 mg/Kg; i.d.) em ratos no edema induzido por CA e PLA ₂ do veneno de <i>C.d.collilineatus</i> .	38

Figura 3.11 Efeito do tratamento neonatal com capsaicina (50 39
mg/Kg; i.d.) em ratos no edema induzido por CA e PLA₂
do veneno de *C.d.cascavella*.

Figura 3.12 Efeito da co-injeção das PLA₂ de *C.d.terrificus*, 40
C.d.collilineatus e *C.d.cascavella* com antagonista de
receptor NK₁ de taquicininas, SR140333 (1nmol/sítio).

O fracionamento do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.terrificus*), *Crotalus durissus collilineatus* (*C.d.collilineatus*) e *Crotalus durissus cascavella* (*C.d.cascavella*) em coluna Superdex G-75 mostrou a presença de quatro picos principais. O pico reconhecido como crotoxina nas três espécies crotálicas foi purificado em HPLC de fase reversa, e mostrou a presença das isoformas de crotapotinas (CA) e fosfolipase A₂ (PLA₂), que variam quantitativamente entre os três venenos. A eletroforese também foi compatível quanto as regiões de massa molecular esperadas para a frações (Ctx, PLA₂ e CA) dos três venenos, mostrando que há alta homogeneidade molecular entre as mesmas.

O extravasamento plasmático evocado pela (CA; 1µg/sítio) e (PLA₂ ; 0,5µg/sítio) de *C.d.terrificus* , *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* foi avaliado na microvasculatura de pele dorsal de ratos através do acúmulo local da mistura de albumina bovina marcada com ¹²⁵I e azul de Evans, previamente administrada pela via endovenosa (e.v.). A injeção intradérmica (i.d.) das CA e PLA₂ dos três venenos crotálicos induziu aumento na permeabilidade microvascular de maneira significativa para as PLA₂s, mas não para as CAs.

O tratamento prévio (30 min) com o antagonista de receptores de histamina e 5-HT (ciproheptadina; 2mg/Kg) inibiu significativamente o extravasamento plasmático evocado pelas PLA₂ dos três venenos testados (0,5 µg/sítio). O antagonista seletivo de receptores NK₁ de taquicininas, SR140333 (1nmol/sítio), inibiu significativamente o extravasamento plasmático evocado pelas PLA₂s. Em ratos neonatos tratados com capsaicina (50mg/Kg; s.c.), o extravasamento plasmático induzido pelas três PLA₂s crotálicas foi significativamente inibido.

Em resumo, nossos resultados fornecem evidências que PLA₂s de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* podem atuar como substâncias neurogênicas pró-inflamatórias, enquanto que as CAs não têm papel semelhante.

The fractionament of the crude poison of *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.terrificus*) , *Crotalus durissus collilineatus* (*C.d.collilineatus*) and *Crotalus durissus cascavella* (*C.d.cascavella*) in column Supherdex G-75 showed the presence of four main picks. The pick recognized as crotoxina in the three species crotalics was purified in reverse phase HPLC , and showed the presence of the crotapotins (CA) and fosfolipase A₂ (PLA₂) isoforms, that vary quantitativamente among the three poisons. The eletroforesis was also compatible as the areas of molecular mass expected for the fractions (Ctx, PLA₂ and CA) of the three poisons, showing that there is discharge molecular homogeneity among them.

Plasma extravasation evoked by the (CA; 1µg/site) and (PLA₂; 0,5µg/site) of *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* and *C.d.cascavella* was evaluated in the microvasculature of rats dorsal skin through the local accumulation of the mixture of bovine albumin marked with I¹²⁵ and Evans blue previously administered by the endovenosa road (e.v.). The intradermic injection (i.d.) of CA and PLA₂ of the three crotalics poisons induced an increase in the microvascular permeability in a significant way for PLA₂s, but not for CAs.

Previous treatment (30 min) with histamine and 5-HT receptor antagonist (ciproheptadina; 2mg/Kg; i.p.) inhibited the plasma extravasation significantly evoked by PLA₂ from the three venons tested (0,5 µg/site). The takicinin NK1 receptor selective antagonist, SR140333 (1nmol/site), inhibited the plasma extravasation significantly evoked by PLA₂s. In neonatal capsaicin treated rats (50mg/Kg; s.c.), the plasma extravasation induced by three crotalics PLA₂s was significantly inhibited.

In summary, our results supply evidences that PLA₂s from *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* and *C.d.cascavella* can act as proinflammatory neurogenics substances, while CAs don't have similar role.

INTRODUÇÃO

Os ofídios, também conhecidos como cobras ou serpentes, são animais vertebrados que juntamente com os lagartos, os jacarés e as tartarugas, pertencem ao grupo dos répteis - Classe Reptília.

Pelas características morfológicas e fisiológicas adquiridas ao longo da evolução, as serpentes se tornaram animais mais adaptados a viver em diversos ambientes; sendo encontrados na superfície ou abaixo do solo, na água e nas árvores. Com exceção de locais muito frios, de algumas altitudes e dos círculos polares, as cobras habitam praticamente todas as regiões do planeta.

Restringindo-se mais especificamente às Américas, uma das espécies mais comuns no oeste norteamericano é a serpente cascavel, conhecida também como "Cascavel diamante do oeste". Na região central da Costa Rica e boa parte da América Central, a serpente "Terciopelo" ou *Bothrops asper* é a mais popular e perigosa. A cascavel sulamericana *C.d.terrificus* é a mais abundante no Brasil e parte da Argentina e se diferencia de sua congênera norteamericana pelo seu tipo de veneno, já que o veneno desta última possui uma potente fração neurotóxica enquanto que a primeira possui um veneno fortemente coagulante (Russel, 1983).

O Brasil possui uma das maiores diversidades de répteis do planeta. Das 3000 espécies de serpentes existentes no mundo, o Brasil apresenta cerca de 250 espécies das quais, cerca de 70 são venenosas. No grupo de serpentes, a variedade de espécies é igualmente rica, com notável diferenciação regional em relação à composição da fauna ofidiana (Meneses, 1974).

Serpentes como a cascavel, as jararacas e as surucucus pertencem à família *Crotalus* e possuem uma característica em comum – a fosseta loreal, um orifício localizado entre o olho e a narina, em cada lado da cabeça. A fosseta loreal é um órgão sensível ao calor o que permite às serpentes perceberem as diferenças de temperatura do ambiente, auxiliando-as para que possam se orientar e caçar a noite, mesmo em ausência de luz. Além da fosseta loreal, as crotalíneas possuem características em comum como: presença de pequenas escamas na parte de cima da cabeça; partes superior e lateral do corpo recobertas por escamas em forma de quilha, possuem glândulas produtoras de veneno, localizadas na cabeça, dentes inoculadores de venenos grandes, móveis e localizados na região anterior da boca (solenóglifas). A

cascavel é a única que possui o guizo ou chocalho. As serpentes não venenosas possuem dentição aglifa, ou seja, não existem dentes inoculadores de venenos, nem glândulas produtoras de veneno, como no caso das jibóias, sucuris, cobras-d'água e boipevas, com exceção da coral que possui o mesmo tipo de dentição e é venenosa (Iwanaga & Susuki, 1972).

A cascavel brasileira é denominada de *Crotalus durissus sp.* Em algumas regiões do Brasil, a cascavel também é conhecida como, boicininga, maracabóia ou cascavella. A cascavel vive em áreas abertas como campos, regiões secas e pedregosas, podendo ser encontradas também em regiões de cerrado, pastos e em culturas pouco irrigadas, como as de café e soja. Quando adultas, chegam a medir 1,6 metros de comprimento. São vivíparas e os filhotes nascem no verão. Quando ameaçada, a cascavel movimenta a cauda produzindo um ruído característico com seu chocalho. As mudas de pele acrescentam novos anéis ao chocalho, podendo ocorrer mais de uma vez por ano (Soerensen, B., 2000).

A crotoxina é a fração que representa cerca de 65% do veneno total da *Crotalus durissus sp.* Ela constitui o seu principal componente ativo, responsável pela inibição dos movimentos musculares, por inibir a liberação de acetilcolina ao nível das junções neuromusculares pré-sinápticas (Strong & Dowdall, 1987; Hawgood, 1991; Bon e col., 1979; Harris, 1985; Faure, 1999) e pós-sinápticas (Hanley, 1979; Hawgood, 1989); com isso, impede a transmissão do estímulo nervoso para o músculo se contrair. Elas causam morte por falência respiratória, sendo a ptose palpebral um dos primeiros sinais de que o veneno está agindo. Os soros anticrotálicos para o uso humano no Brasil são produzidos atualmente por três laboratórios: Instituto Butantan (SP), Fundação Ezequiel Dias (MG) e Instituto Vital Brasil (RJ).

A crotoxina é uma α -neurotoxina pré-sináptica presente nos venenos de serpentes da América do Sul (Hendon, 1971; Rübsamen, 1971). Esta toxina é uma proteína heterodimérica composta por duas subunidades ligadas não-covalentemente: a crotapotina (CA), uma subunidade de caráter ácido, não tóxica, não enzimática (Kouyoumdjian, 1986; Faure, 1991) com uma massa molecular de 9 kDa, e uma básica, fosfolipase A₂ (PLA₂) de massa molecular de aproximadamente 15 kDa (Faure, 1991, 1988; Aird e col., 1986), sendo na sua maioria, enzimas cálcio-dependentes que

hidrolizam a ligação 2-éster do 1,2-diacyl-3sn fosfoglicerídeo (Dennis, 1998). O complexo heterodimérico CA-PLA₂ é responsável pela toxicidade do veneno. A subunidade CA aumenta a potencia letal da subunidade PLA₂, formando com ela um complexo ternário que proporciona a sua ligação ao sítio de crotoxina localizado em membranas pré-sinápticas; após essa ligação, CA se libera da subunidade PLA₂ (Faure, 2000; Krizaj, 1997). A dissociação das subunidades é reversível. Tem sido proposto que a crotapotina funciona como uma molécula "chaperon", prevenindo uma ligação não-específica da PLA₂ (Stoker, 1990). A PLA₂ possui atividade tóxica ou neurotóxica reduzida quando separada do complexo original com a crotapotina (Breithaupt, 1976; Bon e col., 1979).

De acordo com Faure e col. (1994), suas isoformas constituintes (CA e PLA₂) parecem ser resultantes de: 1) modificações pós-traducionais que ocorrem sobre uma única forma precursora, levando à formação de crotapotina (Bouchier col., 1991; Faure e col., 1991) ou 2) a expressão de diferentes RNAs mensageiros (isolados a partir de uma mesma espécie) levando à formação das isoformas de PLA₂ (Faure e col., 1994).

As PLA₂s encontram-se classificadas em XI grupos distintos, de acordo com: a) origem: extracelular, com baixo peso molecular (14-18 kDa) são denominadas de fosfolipases pancreáticas (sPLA₂) e intracelulares ou citosólicas (cPLA₂), de alto peso molecular (31-110 kDa); b) conforme a sua estrutura primária e c) pontes de sulfeto (Denis, 1994 e Capper & Marchal, 2001)

O grupo I compreende as PLA₂s do pâncreas de mamíferos e dos venenos de cobras das famílias Elapidae e Hydrophidae.

O grupo II compreende as PLA₂s de venenos de crotalidae, viperidae e PLA₂s do grupo IIA de mamíferos. Todas estas são estruturalmente estabilizadas por pontes de sulfeto. Cataliticamente este último tipo requer histidina no seu sítio ativo e necessita de Ca⁺² como co-fator para hidrólise (Seilhamer e col., 1989).

O grupo III é representado pelas sPLA₂ provenientes dos venenos de vespas, abelhas (Hoffman & Jacobson, 1996) e do lagarto *Heloderma* (Vandermeers e col., 1991), água viva (Lotan e col., 1995) e escorpião (Conde e col., 1999).

O grupo IV de alto peso molecular (cPLA₂ de 85KDa) é expressado por quase todas as células de mamíferos (Denis, 1994).

Recentemente, as PLA₂ foram divididas em 11 grupos (I-XI). As PLA₂ dos grupos I a IV permaneceram com esses números, mas outras PLA₂ foram descobertas e novos grupos foram estabelecidos, a saber:

O grupo V apresenta 40% de homologia com a enzima do tipo IIA de 14 kDa humana, tendo similares sítios catalíticos e ligantes de Ca⁺² porém, não apresentam o propeptídio visto na isoforma tipo IB, nem a extensão C-terminal característica do tipo IIA (Chen e col., 1998; Han S_K e col., 1998).

O grupo VI inclui as PLA₂ independentes de Ca⁺² (iPLA₂) para a sua atividade, como exemplo, células miocárdicas humanas e caninas (Ackermann e col., 1994; Gross, 1998).

Os grupos VII e VIII compreendem as sPLA₂ que possuem cerca de 45 kDa, sendo também denominadas de PAF acetilhidrolase a e b, respectivamente. Estas enzimas possuem atividade de PAF acetilhidrolase e foram identificadas na circulação sanguínea da maioria dos animais e no cérebro de bovinos.

O grupo IX é constituído de sPLA₂ isoladas de venenos do caracol marinho e são também denominadas de conodipine M (Dennis, 1997).

O grupo X compreende as sPLA₂ encontradas em leucócitos, fígado, timo e células endoteliais alveolares. Desempenhando importante papel na inflamação e na transdução de sinais (Valentin e col., 1999 e Cupillard e col., 1997).

O grupo XI é constituído pelas sPLA₂ de plantas (Six and Dennis, 2000 e Stahl, 1999).

Dois tipos de receptores de sPLA₂ foram descritos: o receptor do tipo N (Neural), expresso principalmente em células neurais, liga-se com alta afinidade às sPLA₂ de venenos neurotóxicos e o receptor do tipo M (muscle) expresso por células do músculo esquelético, dos pulmões, rins e fígado, e que não têm afinidade pelas sPLA₂ neurotóxicas (Lambeau & Lazdunski, 1999 ; Rizzo e col., 2000).

Por catalisar a reação de hidrólise que libera o ácido graxo e lisofosfolípidios, as PLA₂s desempenham papel em vários processos biológicos incluindo homeostase de membranas celulares, digestão de lipídios, defesa do hospedeiro, transdução de sinais e produção de mediadores lipídicos como os eicoisanóides e derivados dos lisofosfolípidios, os quais desempenham diversas ações biológicas. Historicamente, a

atividade das PLA₂s foi primeiro observada no suco pancreático e em venenos de serpentes (Denis, 1997) sendo então proposto o seu papel na digestão de lipídios nos intestinos. Por causa da sua particular abundância em venenos e da sua fácil purificação, as PLA₂s de venenos foram as primeiras PLA₂s estudadas. Estas enzimas têm sido estudadas por mais de 4 décadas e os dados acumulados indicam que há uma enorme diversidade molecular entre as PLA₂s de venenos, representadas em formas cataliticamente ativas e inativas (Lambeau, 1999; Murakami, 1997).

Segundo Valentin (1999) os efeitos tóxicos das PLA₂s dos venenos não devem ser facilmente correlacionados com a sua atividade catalítica, onde sugere-se que elas possam se ligar especificamente às proteínas alvo, como também que as PLA₂s de venenos podem exercer efeitos farmacológicos independentes de sua atividade enzimática. A presença de uma diversidade molecular de PLA₂s foi primeiro cogitada em venenos de animais, especificamente em venenos de serpentes (Kini, 1997). Uma simples espécie de serpente pode conter cerca de 15 PLA₂s distintas em seu veneno e o nível de identidade entre essas enzimas pode oscilar em cerca de 40 a 99%, e cada enzima pode ter efeitos tóxicos ou farmacológicos distintos. Essa diversidade molecular pode ser resultante de seleção Darwiniana positiva (Kordis e col., 1998; Ohno e col., 1998). A caracterização global das PLA₂s de vários venenos foi conduzida para determinar mais de 200 seqüências de proteínas, a maioria delas de venenos de serpentes, com exceção da Mconodipin do caracol *Conus magus* (McIntosh, 1995). Todas as PLA₂s de venenos contêm cerca de 120-135 aminoácidos, várias pontes de sulfeto e têm uma alta conservação da estrutura tridimensional. Além disso, a maioria dessas PLA₂s têm atividade catalítica, mas a caracterização sistemática destas tem conduzido para a identificação de várias variantes de PLA₂-like cataliticamente inativas (Gutierrez e col., 1995; Ward e col., 1998). As PLA₂s de venenos cataliticamente ativas são dependentes da concentração milimolar de Ca⁺², os resíduos envolvidos na catálise e ligação de Ca⁺² são perfeitamente conservados, levando para um limiar de identidade em cerca de 30% entre as PLA₂ de qualquer veneno de algum grupo. A maioria das PLA₂s de venenos ocorrem como monômeros, e uma quantidade pequena de PLA₂s de venenos de serpentes são homomultiméricas ou heteromultiméricas (Hawgood & Bom, 1991). Segundo o levantamento feito por Valentin & Lambeau, (2000) no banco de

dados genômicos, há indícios que a diversidade das PLA₂s também ocorre entre as plantas e invertebrados (ver Fig.1). A estrutura molecular de diferentes PLA₂s de plantas mostra homologia com as PLA₂s de animais somente na alça de Ca⁺² e nos domínios do sítio ativo, definidos claramente em um terço da coleção das PLA₂. A alça de Ca⁺² e os domínios do sítio ativo formam um núcleo padrão o qual é encontrado em todas as PLA₂s e constituem a característica chave das mesmas, podendo-se sugerir então, que as outras regiões das PLA₂s ao redor da alça Ca⁺² e do sítio ativo possam ter evoluído diferentemente para gerar propriedades catalíticas específicas e/ou outras funções biológicas.

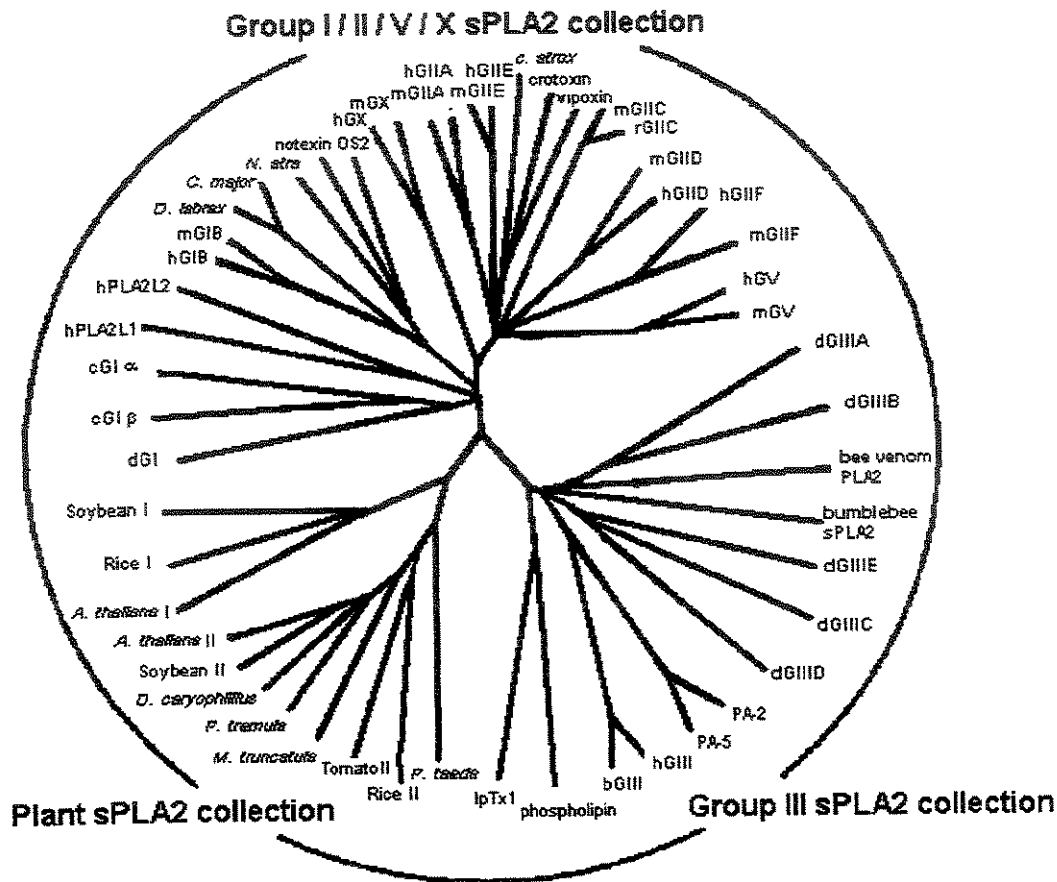


Figura 1.1- Árvore filogenética da identidade sequencial das famílias de PLA₂. As espécies de PLA₂ estão abreviadas com a seguinte nomenclatura: b, c, d, m, h, r para bovino, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, camundongo, humana e de rato, respectivamente, seguido pelo grupo a que pertencem (GI, GII, GIII, GV e GX) e subgrupo (A, B, C, D, E, F) (Valentin & Lambeau, 2000).

As PLA₂ de serpentes podem ser miotóxicas, neurotóxicas, cardiotoxícas, citotóxicas, convulsivantes, hipotensoras e pró-inflamatórias, como também podem interferir com processos de coagulação e na agregação de plaquetas (Kini, 1997; Valentin e col., 2000). A atividade miotóxica é em decorrência de uma série de eventos degenerativos junto à membrana plasmática evoluindo para necrose da musculatura esquelética (Gutiérrez, 1995). Elas são divididas em dois grupos que compreendem: (1) miotoxinas enzimaticamente ativas (PLA₂ Asp-49) e (2) miotoxinas desprovidas de atividade enzimática ou com atividade enzimática desprezível (PLA₂ Lis-49); e ambas as PLA₂ cataliticamente ativas ou inativas podem exercer efeitos fisiológicos (Valentin & Lambeau, 2000). Uma grande parte do dano tecidual local induzido pelo veneno crotálico é devido a um aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de proteínas plasmáticas, infiltrado de polimorfos nucleares e macrófagos (Rosenfeld, 1971; Sawai, 1980).

Pérez e col., (1998) demonstram que o veneno de *C.d.terrificus* causa infiltrado inflamatório ao redor de fibras nervosas, mas não causa hemorragia, e possui pequena atividade edematogênica.

Segundo Liu e col. (1991) e Tan e col. (1991), todas as PLA₂ que causam edema têm sido isoladas do veneno de serpentes. Eles sugerem que a PLA₂ induzem edema por dois diferentes mecanismos: (a) pela liberação do ácido araquidônico como consequência da degradação enzimática do fosfolipídio de membrana, acentuando a biossíntese dos eicosanóides, e (b) por afetar diretamente na microvasculatura. Lomonte e col.(1994) observaram que a miotoxina II, uma lisina-49 PLA₂ isolada do veneno de *B. asper* é citotóxica para células do endotélio venular. Além disso, Edelson e col.(1991) e Arbibe e col.(1998) sugerem que a PLA₂ de *B. asper* induzem alterações microvasculares em pulmão de ratos e desenvolvem uma variedade de reações inflamatórias (Pruzanski & Vadas, 1991). Além disso, a atividade da PLA₂ pode ser devido a isoformas presentes no veneno ou, alternativamente, por aumentar a atividade da PLA₂ endógena a qual é sintetizada e liberada no local da reação inflamatória provocada pela injeção do veneno na região plantar da pata de camundongos (Chavez & Gutiérrez, 1995).

Apesar de numerosos estudos realizados, as bases moleculares para a ação farmacológica seletiva e específica das PLA₂ ainda não estão claras. É possível que tanto a hidrólise dos fosfolipídios como a ligação a um receptor específico para PLA₂ na superfície celular sejam requeridos para um efeito farmacológico particular. Há poucos anos atrás, Kini & Evans (1989) propuseram um modelo para explicar os diferentes efeitos farmacológicos das PLA₂. Este modelo era baseado na presença de sítios ligantes específicos localizados na superfície células alvo os quais tinham alta afinidade por PLA₂ específicas, mas não por PLA₂ não-específicas.

Neste estudo, abordamos as PLA₂ de serpentes devido estas possuírem semelhanças com as PLA₂ do tipo IIA de humanos. Elas são muito exploradas como modelos de inflamação, sendo denominadas de PLA₂s pró-inflamatórias, responsáveis pela indução da migração de células do sistema leucocitário (quimiotaxia), e por apresentarem um inibidor natural, como o extraído do soro da *C.d.terrificus*(CICS), capaz de abolir a atividade PLA₂ da crotoxina e neutralizar in vivo a toxicidade desta crotoxina (Fortes-Dias e col. 1991, 1995; Perales e col., 1995; Ovadia e col., 1977; Faure e col., 2000).

1.1. Inflamação

A inflamação pode ser definida como uma reação da microcirculação induzida por uma injúria aos tecidos, com a conseqüente movimentação de elementos intravasculares, como fluidos, células e moléculas, para o espaço extravascular. Ela é caracterizada por alterações no calibre vascular, com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo; alterações estruturais nos componentes da microcirculação, acarretando em aumento da permeabilidade vascular e na saída de células e moléculas dos vasos para os tecidos; migração de células de defesa (leucócitos) e acúmulo no espaço extravascular, onde ocorreu a injúria. A agressão tecidual é o agente desencadeador da resposta inflamatória, por induzir o rompimento da homeostasia mantida através da relação célula-meio, este último representado pelos fluidos extracelulares e a microcirculação. A agressão tecidual pode ser de origem biológica (microorganismos), física (mecânica, térmica e radiação) ou química. Ao nível macroscópico, a resposta

inflamatória geralmente é acompanhada de sinais clínicos bem conhecidos como eritema, calor, edema, dor e perda da função (Siqueira Jr., 2000).

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

1.1.1-Mediadores vasoativos

- Histamina e serotonina;
- Metabólitos do ácido araquidônico (AA);
- Fator de agregação plaquetária (PAF):
- Adenosina;
- Óxido nítrico;
- Outros mediadores: neuropeptídeos

1.1.2- Mediadores quimiotáticos

- citocinas: IL-1, IL-8, $TNF\alpha$, $TNF\beta$ e SP;
- componentes do complemento: especificamente C5A;
- PAF (direcionado a neutrófilos e eosinófilos);
- produtos da via lipoxigenase, basicamente LTB₄.

1.1.3-Mediadores enzimáticos

- Sistema complemento: C3A, C5A, C3B E C3BI E C5B-9;
- Sistema cinina :Brdicinina;
- Sistema de coagulação: trombina e fator Xa

1.1.4- Proteoglicanas

- Espécies reativas de oxigênio
- Fatores de crescimento

As respostas inflamatórias ocorrem em três fases diferentes, cada qual aparentemente mediada por mecanismos diversos: (1) fase transitória ou aguda é uma

resposta imediata, que tem curta duração, sejam minutos, horas ou não excedendo a dois ou três dias. É caracterizada por vasodilatação localizada e aumento da permeabilidade microvascular; (2) fase subaguda ou tardia, marcada principalmente pela infiltração de leucócitos da microcirculação, principalmente neutrófilos, e células fagocitárias; e (3) fase proliferativa ou crônica, na qual há degradação tecidual e fibrose, durando muitos dias, meses ou até mesmo anos em algumas doenças não-tratadas (Siqueira Jr., 2000).

1.2. Inflamação neurogênica

A pele é inervada por fibras autonômicas simpáticas as quais inervam, principalmente, os folículos pilosos e plexos cutâneos de todo o corpo, bem como por fibras nervosas aferentes primárias sensoriais. Morfologicamente, as fibras nervosas aferentes são divididas em duas classes: A-delta (A- δ) e C. As fibras (A- δ) são mielínicas, de grande diâmetro e de rápida condutância, ao passo que as fibras C possuem diâmetro pequeno, são amielínicas e têm velocidade de condutância mais lenta (Holzer, 1991).

Grande parte desses neurônios tem o corpo celular localizado no gânglio dos nervos espinais ou na raiz espinal dorsal (ou cranial), e axônios que terminam na medula espinal ou no tronco do encéfalo (Young & Young, 1998). São designados neurônios de primeira ordem, tendo apenas um prolongamento, o axônio, que se bifurca em um ramo periférico e em um ramo central. O ramo central penetra na raiz dorsal do nervo espinal ou craniano, finalmente, culminando em terminações nervosas que respondem a tipos específicos de estímulos, denominados de receptores sensoriais (Young & Young., 1998). Os receptores podem ser divididos em três grupos a seguir: mecanoreceptores (respondem à informação originada no próprio receptor ou nos tecidos que o circundam, e são associados ao tato, à pressão, à vibração e as sensibilidades de posição dos membros e ao movimento), nociceptores (respondem à dor) e os termoreceptores (respondem aos estímulos quentes e frios). Com base em critérios funcionais, existem três tipos de nociceptores associados a dois tipos de fibras nervosas aferentes: 1) nociceptores mecanossensíveis com fibras A-delta; 2)

nociceptores mecanotérmicos com fibras A-delta; 3) nociceptores polimodais com fibras C, os quais respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (Noback e col., 1999) 1999). Com a ocorrência do trauma ou inflamação, os tecidos lesados liberam mediadores químicos que podem sensibilizar ou mesmo ativar os nociceptores A-delta e C a liberarem neuropeptídeos tais como a substância P, que pode, por sua vez, estimular mastócitos locais a liberar histamina que ativaria os nociceptores (Noback e col., 1999).

Eventos vasculares tais como vasodilatação e aumento da permeabilidade microvascular decorrentes da liberação de neuropeptídeos, como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), de neurônios aferentes primários, frente à estimulação química, mecânica ou térmica, representam a inflamação neurogênica (Lembeck e Holzer, 1979; Baluk, 1997). Uma vez liberadas, essas substâncias atuam em células-alvo através de receptores específicos, causando efeitos pró-inflamatórios diversos, tais como vasodilatação arteriolar, com o aumento de fluxo sanguíneo local, aumento da permeabilidade venular, alterações na contratilidade do músculo liso, degranulação de mastócitos e uma variedade de efeitos sobre o recrutamento de leucócitos e fibroblastos (Holzer, 1992; Maggi, 1995).

Com a descoberta de neuropeptídeos como a substância P (Von Euler & Gaddum, 1931), confirmou-se o conceito de que alguns neurônios utilizam mecanismos de transmissão independentes dos mediadores clássicos noradrenalina e acetilcolina. Embora as ações desses neurônios sensoriais tenham sido descritas recentemente, o descobrimento dessas fibras data do milênio passado. Stricker, (1876) foi o primeiro pesquisador a observar que a estimulação elétrica de terminações nervosas periféricas de raízes dorsais transsecadas causa vasodilatação na área da pele innervada por fibras nervosas sensoriais. Bayliss (1901) e Bruce (1913) demonstraram que a vasodilatação produzida pelo estímulo antidrômico é inalterada pela remoção de gânglios simpáticos ou pela separação das raízes dorsais entre o gânglio e a medula; porém, a remoção do Gânglio da raiz dorsal e a conseqüente degeneração dos neurônios sensoriais por substâncias como a capsaicina (substância irritante extraída de pimentas vermelhas do gênero *Capsicum*; Jancsó-Gabor; Szolcsanyi, 1977), previne completamente a vasodilatação induzida pelo estímulo antidrômico. Então, concluiu-se que a

vasodilatação era provocada por impulsos nervosos que se propagavam no sentido eferente das fibras nervosas sensoriais, promovendo liberação de substâncias vasoativas tais como substância P e CGRP (Holzer, 1992). Os neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina foram denominados CSPA de "capsaicin-sensitive primary afferent neurons" (Szolcsanyi, 1977); eles são compostos por terminais periféricos, terminal central e corpo do neurônio (pericário), onde postula-se que os neuropeptídeos sejam sintetizados a partir de seus precursores no gânglio da raiz dorsal e imediatamente, transportados para os terminais nervosos periféricos e central, cuja liberação resulta nas respectivas funções eferentes e aferentes (Lundberg, 1996).

Neuropeptídeos como encefalina, taquicininas como a substância P, neuropeptídeo Y, PVI, CGRP, opióides, somatostatina, óxido nítrico e purinas como ATP ou adenosina podem ser liberadas nas terminações nervosas sensoriais (Maggi, 1991; Brain, 1996; Holzer, 1998). Essas substâncias podem despolarizar ou hiperpolarizar as terminações nervosas ou células pós-sinápticas.

1.3. Agonistas e antagonistas de receptores de taquicininas

A substância P e as neurocininas A (NKA) e B (NKB) pertencem à família das taquicininas. Em geral as taquicininas atuam como agonistas de seus respectivos receptores NK₁, NK₂ e NK₃ (Regoli et al., 1989), sendo que a substância P liga-se preferencialmente ao receptor NK₁, enquanto a NKA e NKB ligam-se preferencialmente aos receptores NK₂ e NK₃, respectivamente (Regoli et al., 1989; Maggi, 1995). A substância P é o principal mediador da responsável pelo aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, pelo extravasamento de proteínas plasmáticas e formação de edema na pele de roedores e humanos (Xu e col., 1992), onde sugere-se que estes efeitos sejam devidos a estimulação direta dos receptores NK₁, localizados nas células endoteliais das vênulas pós-capilares, ou pela ativação de mastócitos através da interação de cargas iônicas entre estes que levaria a liberação de histamina e 5-HT (Brain & Williams, 1989) ou pela ativação direta devido à presença de receptores Nk₁ de taquicininas nos mesmos (Ogawa e col., 1999). Com o desenvolvimento e síntese de antagonistas não-peptídicos com potentes ações

seletivas para os receptores NK₁ como o (SR140333) e o NK₂ (SR48968; Garret e col, 1991; Emonds-Alt e col, 1992), mostrou-se em estudos *in vivo* que o SR140333, mas não o SR48968, reduz significativamente o extravasamento plasmático induzido por estimulação térmica e antidrômica na pele de ratos, bem como aquele induzido pelo GR73632, agonista de receptores NK₁ (Towler & Brain, 1998).

1.4. Estudo do Papel das isoformas de Crotapotinas e PLA₂s crotálicas na inflamação aguda experimental

Peptídeos ou proteínas de veneno de serpentes, microorganismos ou de vegetais têm sido largamente utilizados como ferramentas moleculares dentro da fisiologia, farmacologia, imunologia e da terapêutica médica como sondas moleculares, possibilitando a síntese de novas drogas e novos agentes terapêuticos. O exemplo maior disso é o Captopril, que foi sintetizado a partir do modelo molecular da toxina de *Bothrops jararaca* (Harvey et al., 1998).

As PLA₂ são enzimas amplamente distribuídas pelo nosso organismo, são responsáveis pela digestão de lipídios até uma série de atividades biológicas como no caso de PLA₂ de serpentes, especialmente as bothrópicas.

As PLA₂ de serpentes são conhecidas e muito exploradas como modelos de inflamação, sendo denominadas de PLA₂ pró-inflamatória, são responsáveis também pela indução da migração de células do sistema leucocitário (quimiotaxia).

Do ponto de vista clínico, o processo inflamatório pode ser maléfico para o organismo, podendo levar a morte, como um exemplo, o processo inflamatório gerado por alérgenos.

Landucci e col. (1994) descrevem que a crotapotina de *Crotalus durissus terrificus* possui atividade antiinflamatória. Existe a possibilidade de que esse efeito seja decorrente da interação desta crotapotina com as fosfolipases A₂ extracelulares geradas durante o processo inflamatório. Além disso, Landucci e col., (2000) também demonstraram a capacidade da crotapotina de *C.d.terrificus* em interagir com PLA₂ de diferentes fontes como: *Naja naja*, *Naja moçambique moçambique*, *Crotalus adamanteus* ou *Apis mellifera*, contudo, ainda não se pôde definir o(s) possível(eis)

mecanismos de ação da crotapotina de *C.d.terrificus* sobre o processo inflamatório. Mesmo devido sua importância, não encontramos nada descrito na literatura em relação as crotapotinas de outras serpentes crotálicas como a *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella*.

Portanto o estudo concomitante de crotapotinas e PLA₂ de serpentes crotálicas é de extremo interesse para saber se elas têm alguma participação na inflamação neurogênica, uma vez que as crotapotinas de *C.d.terrificus* são referidas como sendo não-tóxicas, não-enzimáticas e por possuírem atividade antiinflamatória.

Outro motivo relevante no interesse em estudar as isoformas de Crotapotinas e PLA₂s presentes nos venenos crotálicos é devido ao fato de que as PLA₂s crotálicas possuem uma alta semelhança com as PLA₂ do grupo IIA de humanos (Capper & Marchal., 2001), principais agentes envolvidas no desencadeamento dos processos inflamatórios. Tal estudo nos fornece ferramentas moleculares para tentarmos entender como as PLA₂s atuam, e também, como elas contribuem e interagem em condições normais e patológicas. Dessa forma, a descoberta de reagentes e inibidores específicos para essas isoformas pode contribuir para a compreensão de doenças, corroborando para abrir novos domínios de potencial intervenção terapêutica.

Portanto, isso ressalta a importância não somente acadêmica, como também prática deste trabalho, onde foram isoladas crotapotinas e PLA₂ e suas atividades foram avaliadas no processo inflamatório agudo.

OBJETIVOS

1. Isolar e purificar as isoformas de crotapotina (CA) e PLA₂ presentes nos venenos de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella*;
2. Investigar a capacidade das isoformas presentes nos venenos de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* em promover o aumento da permeabilidade microvascular na pele dorsal de ratos;
3. Investigar o papel de neurônios sensoriais e mastócitos no aumento da permeabilidade microvascular na pele dorsal de ratos induzidos pelas CAs e PLA₂s presentes nos venenos de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella*.

MATERIAIS
&
MÉTODOS

2.1- Purificação e caracterização bioquímica

2.1.1- Procedência dos venenos e reagentes

Os venenos brutos de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella*, foram adquiridos junto ao Instituto Butantan, São Paulo, e CEVAP-UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

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

2.1.2- Purificação das PLA₂ e crotapotinas procedentes do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus colilineatus* e *Crotalus durissus cascavella*

As frações PLA₂ e crotapotina dos venenos de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* foram purificadas através das cromatografias de exclusão molecular em sistema de FPLC e de fase reversa em sistema de HPLC, seguido de eletroforese em PAGE-SDS-Tricina, baseado no método descrito por Landucci e col., (1994), de acordo com o esquema a seguir:

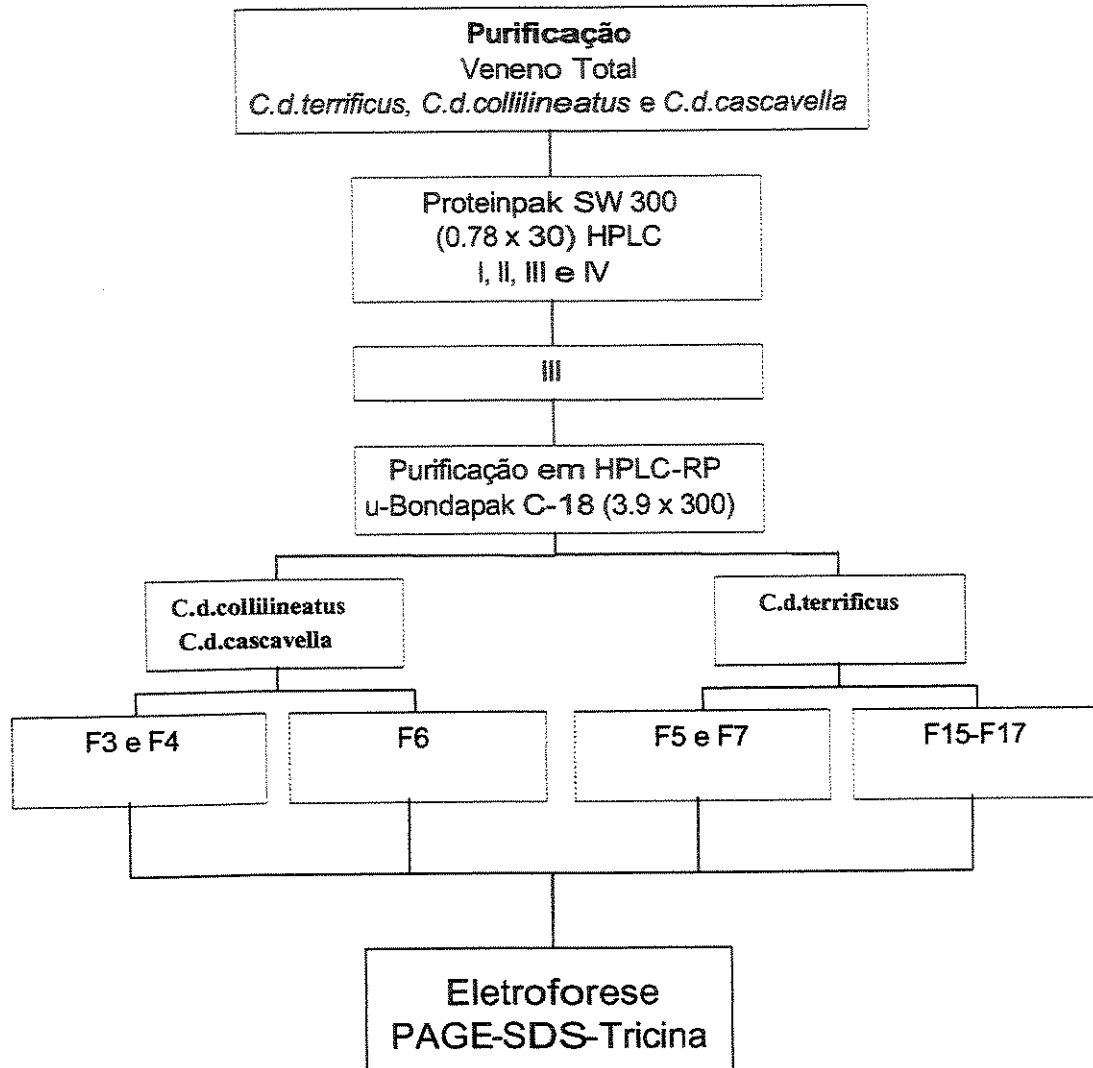


Figura 2.1 Esquema da purificação e caracterização das frações PLA₂ e crotapotinas.

2.1.3- Cromatografia de exclusão molecular em sistema de FPLC dos venenos brutos de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella*

O veneno bruto (75 mg) foi dissolvido em 400 µL de tampão bicarbonato de amônio (0,1M, pH 8,0) e centrifugado a 5000 rpm por 4 min à temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi aplicado em uma coluna de exclusão molecular Superdex G-75, acoplada em sistema de LC- 650 (1,5cm X 75 cm), previamente equilibrada com a solução de bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,2M. A amostra foi aplicada e eluída a 4°C. Frações de 1,0 mL foram coletadas com fluxo constante de 0,3 mL/min e o perfil cromatográfico foi monitorado a 290 nm (Landucci e col., 1994).

2.1.4- Cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC dos venenos de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella*

As frações do veneno foram purificadas em HPLC de fase reversa em uma coluna µ-Bondapak C-18 (0,78 X 30 cm), previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%, pH 3,5 (Tampão A) para a obtenção das frações de crotapotinas e PLA₂. As amostras das frações do veneno foram dissolvidas em 200 µL de tampão A e 200 µL de bicarbonato de amônio 1M, homogeneizadas e clarificadas por centrifugação a 10000 rpm durante 3min. O sobrenadante foi aplicado a coluna, e a eluição das amostras de crotoxina do veneno foi realizada através de um gradiente linear com Acetonitrila 66% (Tampão B). O fluxo foi de 2,0 mL/min e a corrida cromatográfica foi monitorada com uma absorbância de 280 nm (Landucci e col., 1994).

2.1.5- Eletroforese em gel PAGE-SDS-Tricina (16,5%) das amostras do veneno total, crotapotinas e PLA₂ de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.Cascavella*

A eletroforese PAGE-SDS-Tricina foi realizada de acordo com o método descrito por Schägger e Von Jagow (1987) através de um sistema SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments).

2.2- Testes Farmacológicos

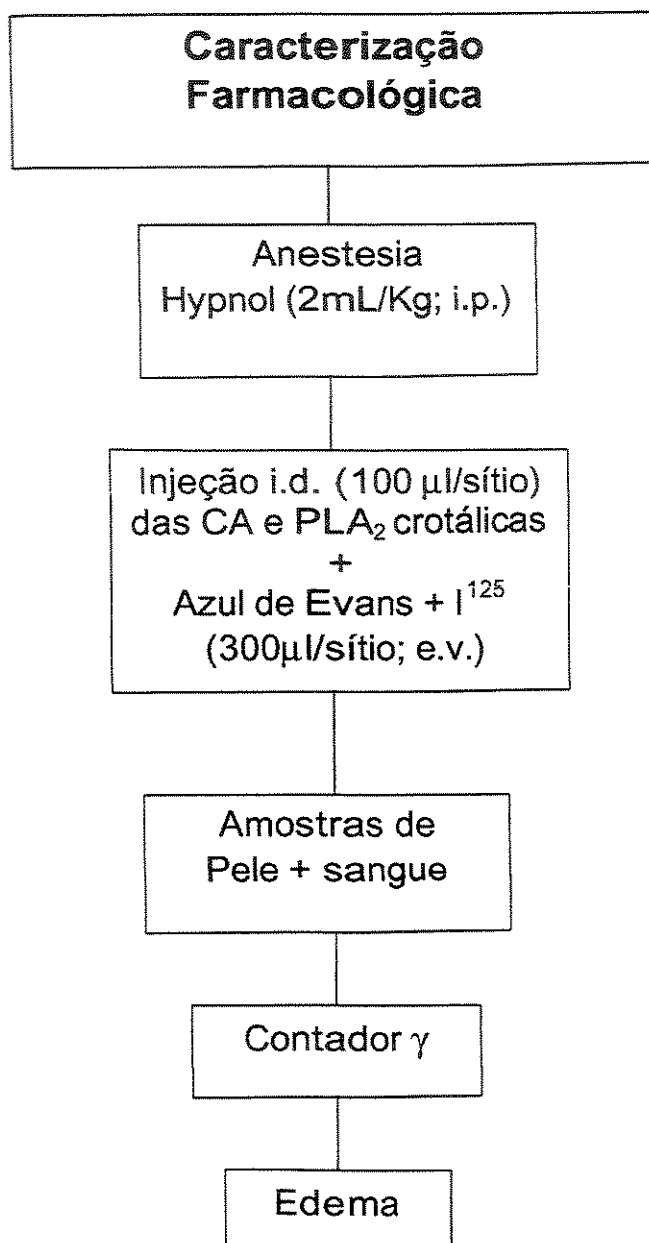


Figura 2.2 Esquema dos ensaios Farmacológicos para a determinação do extravasamento plasmático evocado pelas crotapotinas e PLA₂ crotálicas.

2.2.1- Procedência dos animais utilizados

Os testes farmacológicos realizados neste trabalho foram conduzidos, em sua maior parte, com o emprego de ratos adultos (180-250 g) da espécie Wistar, de ambos os sexos, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP; Campinas/SP). Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* e, dependendo do protocolo experimental, os mesmos foram mantidos conscientes ou anestesiados de forma apropriada com pentobarbital sódico ou halotano.

2.2.2- Determinação do aumento da permeabilidade microvascular cutânea em pele dorsal de ratos

Os ratos foram inicialmente anestesiados com dióxido de carbono (CO₂) e, em seguida, profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg) pela via intraperitoneal (i.p.). A formação do edema em resposta aos agentes administrados intradermicamente foi avaliada em função do acúmulo local da mistura de albumina bovina marcada com I¹²⁵ (2.5 µCi/kg) e azul de Evans (0.3 ml/kg, 2.5% w/v), previamente administrada pela via endovenosa peniana (Brain & Williams, 1995). Em seguida, a pele dorsal dos animais foi depilada, e os agentes previamente dissolvidos em solução Tyrode foram administrados em sítios randomizados, sempre em volume de 100 µl. Os antagonistas foram injetados pela via intradérmica, intraperitoneal ou endovenosa, de acordo com o protocolo em estudo. Após 30 minutos, uma amostra de 5 ml de sangue foi coletada desses animais, através de punção cardíaca. Em seguida, os animais foram sacrificados por superdosagem anestésica, e a pele dorsal foi removida. Os sítios injetados foram recortados (15 mm de diâmetro) e a radioatividade presente em cada amostra de tecido e no sangue foi quantificada em contador gama. O edema formado em cada sítio foi expresso como volume de plasma extravasado em função da contagem obtida em 1 ml de plasma.

2.2.3- Tratamentos

o tratamento prévio dos animais com capsaicina (50mg/kg) ou veículo (1:1:8; Etanol; Tween80; NaCl) foi feito através da injeção subcutânea no segundo dia de vida de ratos wistar machos e fêmeas (Jancsó e col., 1977), onde estes foram utilizados após o período entre 60 e 90 dias. O tratamento prévio dos animais com antagonista duplo de histamina/serotonina (2 mg/kg), foi feito através da injeção intraperitoneal 30 min antes da injeção intradérmica das PLA₂s.

2.2.4- Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) para n experimentos. As comparações estatísticas foram feitas com a aplicação do teste t Student não-pareado ou de acordo com a análise de variância (ANOVA). Valores de $P < 0.05$ foram considerados significantes.

RESULTADOS

3.1-Purificação das isoformas de CA e PLA₂

O fracionamento do veneno total de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* em coluna Superdex G75 em LC-650 (1,5cm X 75 cm), previamente equilibrada com a solução de bicarbonato de amônio 0,2M mostrou a presença de quatro picos principais que foram identificados como convulxina (pico I), giroxina (pico II), crotoxina (pico III) e crotamina (pico IV)(Figura 3.1).

O perfil cromatográfico em HPLC de fase reversa em coluna C-18 μ -Bondapak (0,78 X 30 cm), previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%, pH 3,5 (Tampão A), mostrou que a crotoxina de *C.d.terrificus* contem duas isoformas de crotapotinas (F5 e F7), contudo a crotoxina de *C.d.collilineatus* mostrou a presença de quatro isoformas de crotapotina, sendo duas majoritárias (F3, F4). Este perfil foi semelhante ao da purificação da crotoxina de *C.d.cascavella*.

A análise em HPLC de fase reversa mostrou também que as crotoxinas dos venenos totais de *C.d.cascavella* quanto *C.d.collilineatus* possuem apenas uma única isoforma de PLA₂ (F6), enquanto que a crotoxina do veneno total de *C.d.terrificus* mostrou três isoformas (F15, F16 e F17) (Figura3.2).

A Figura 3.3 mostra A análise dos perfis eletroforéticos mostrou que os venenos *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella*, bem como de suas crotoxinas, PLA₂ e crotapotinas isoladas possuem mobilidade e disposição de bandas eletroforéticas muito semelhantes entre si, onde a crotoxina apresenta-se com uma banda de 26 kDa e as PLA₂ e as crotapotinas com uma massa molecular de 15 kDa e 9 kDa, respectivamente

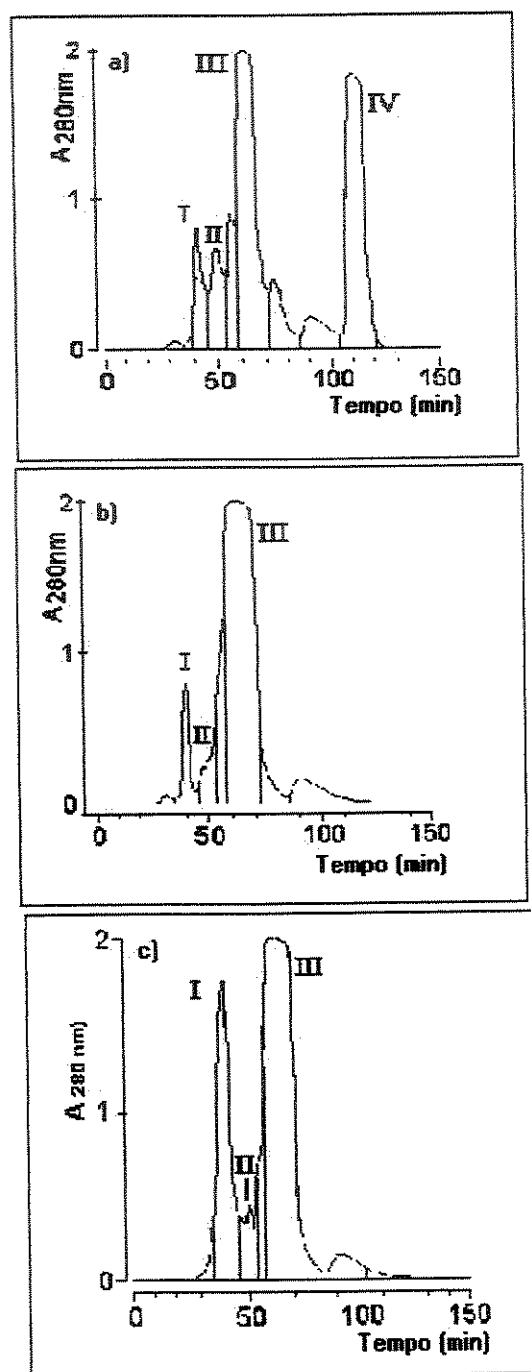


Figura 3.1: Cromatografia de exclusão molecular do veneno total de *C.d.terrificus* (a), de *C.d.colillineatus* (b) e de *C.d.cascavella* (c) em coluna Superdex G75 em LC-650 (1,5cm X 75 cm), previamente equilibrada com a solução de bicarbonato de amônio 0,2M. Os picos I, II, III, IV correspondem respectivamente às frações: convulxina, giroxina, crotoxina e crotamina.

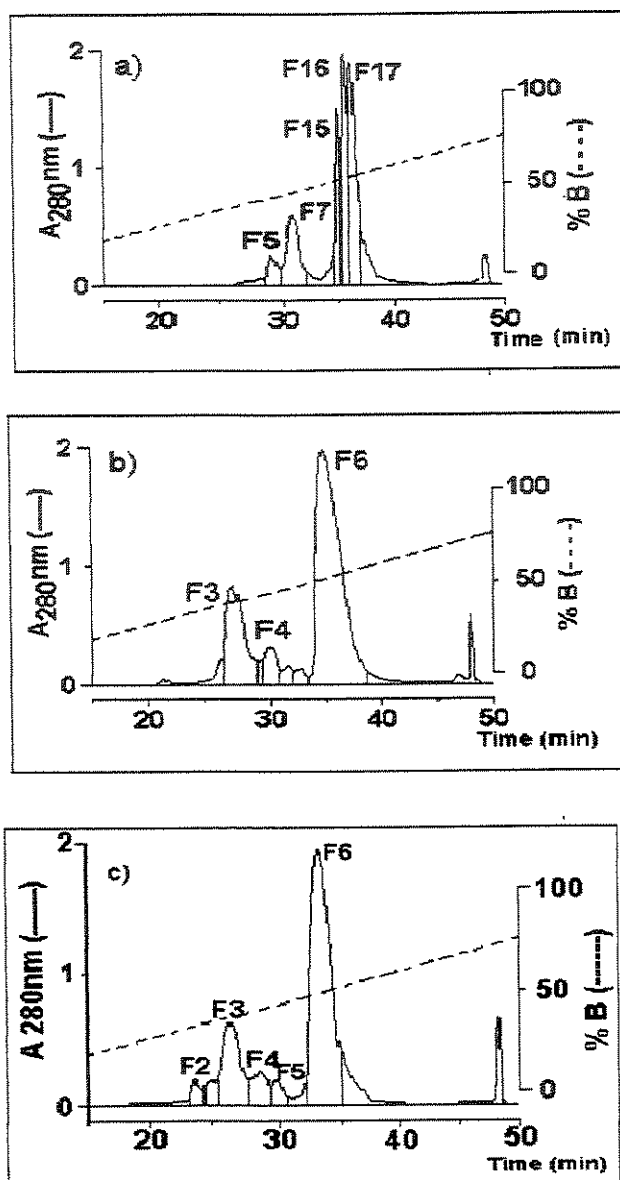


Figura 3.2: Perfil cromatográfico da crotoxina (III) de *C.d.terrificus* (a), *C.d.colillineatus* (b) e *C.d.cascavella* (c) em HPLC de fase reversa em coluna C-18 μ -Bondapak (0,78 X 30 cm) previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%, pH 3,5 (Tampão A). Em (a) F5 e F7 correspondem as isoformas de CA e F15-F17 correspondem as isoformas de PLA₂. Em (b) F3 e F4 correspondem as isoformas de CA e F6 corresponde a isoforma de PLA₂. Em (c) F2-F5 correspondem as isoformas de CA e F6 corresponde a PLA₂.

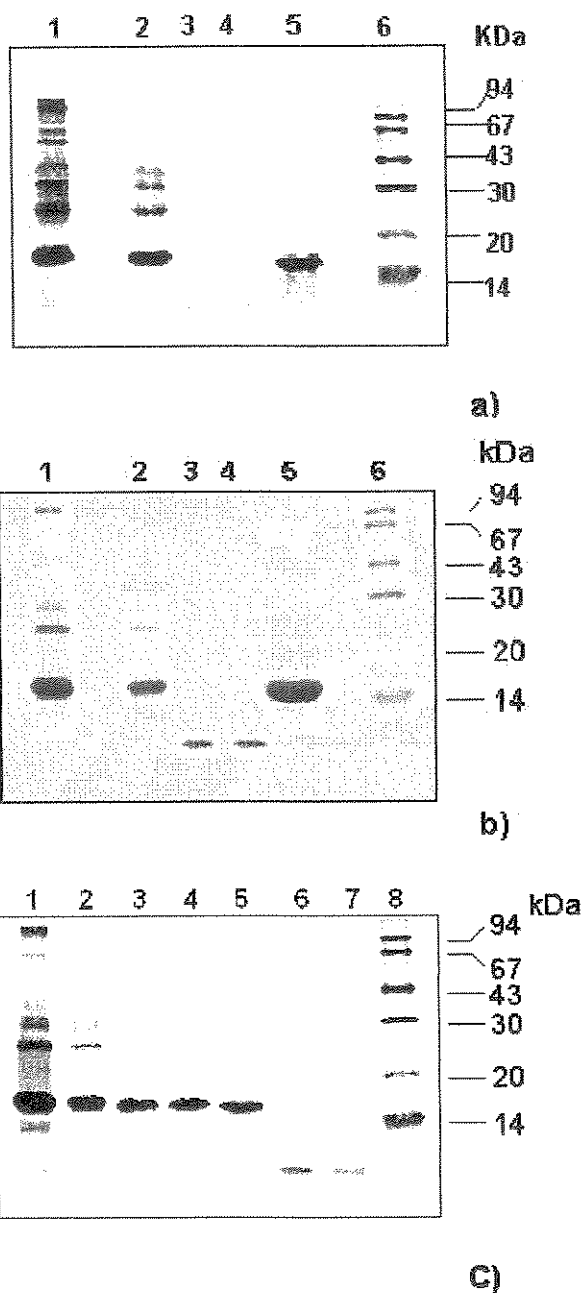


Figura 3.3: Eletroforese em PAGE-SDS-Tricina (16,5%) do veneno total de: a) *C.d.cascavella*, b) *C.d.collilineatus* e c) *C.d.terrificus*. As pistas eletroforéticas correspondem respectivamente: 1- veneno total, 2- crotoxina, 3- CA (F3), 4- CA (F4), 5- PLA₂ reduzida com DTT e 6- marcadores de massa molecular para (a) e (b); Em (c) 3-5 representam PLA₂ (F15-F17) , 6-7- CA (F5 e F7) e 8- marcadores de massa molecular.

3.2-Efeito da injeção intradérmica das CA e PLA₂ de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* em pele dorsal de rato

Foram testadas as diferentes isoformas de CAs e PLA₂, mas apenas as isoformas F5, F7 e F17 de *C.d.terrificus*, F3 e F6 de *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* foram utilizadas.

A injeção intradérmica (i.d.) das CA nas doses de 0.3, 1.0 e 3.0 µg/sítio causou um edema discreto na pele dorsal de rato, quando comparado à resposta obtida com o Tyrode (Figura 3.4). As três PLA₂ crotálicas (50, 100, 250 e 500 ng/sítio) induziram de maneira similar entre si, um significativo extravasamento plasmático.(Figura 3.5).

3.3- Papel dos mastócitos nas respostas induzidas pelas crotapotinas e PLA₂ de *Cd.terrificus*, *C.d.collilineatus*. e *C.d.cascavella* *in vivo*

Quando os ratos foram pré-tratados (30min) i.p. com o antagonista de receptor de histamina e serotonina, ciproheptadina, (2mg/Kg), o extravasamento evocado pelas PLA₂s foi marcadamente reduzido ($p < 0.05$) quando comparado aos seus respectivos controles. A resposta causada pela crotapotina não foi alterada pela ciproheptadina (Figuras 3.6, 3.7, 3.8). O tratamento com ciproheptadina foi efetivo visto que reduziu em 79% o edema evocado pela injeção intradérmica do composto 48/80 (500 ng/sítio), um conhecido agente capaz de desgranular mastócitos *in vivo* e *in vitro*.

3.4- Efeito de antagonistas de receptores NK₁ de taquicinas

A Figura 3.9 mostra que o extravasamento plasmático induzido pelas PLA₂ de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* (0.5 µg/sítio) foi inibido de forma marcante ($p < 0.001$) pela co-injeção com o antagonista seletivo de receptor NK₁ de taquicinas, SR140333 (1nmol/sítio). Injetado isoladamente, o SR140333 não causou extravasamento plasmático significativo ($14 \pm 1\mu\text{l/sítio}$) quando comparado ao tyrode ($21 \pm 3\mu\text{l/sítio}$).

3.5- Efeito do tratamento neonatal com capsaicina

O tratamento neonatal com capsaicina (50 mg/Kg; i.d.) causou inibição significativa do extravasamento plasmático evocado pelas três PLA₂ crotálicas, não modificando a resposta à substância P e crotapotinas (Figuras 3.10, 3.11 e 3.12).

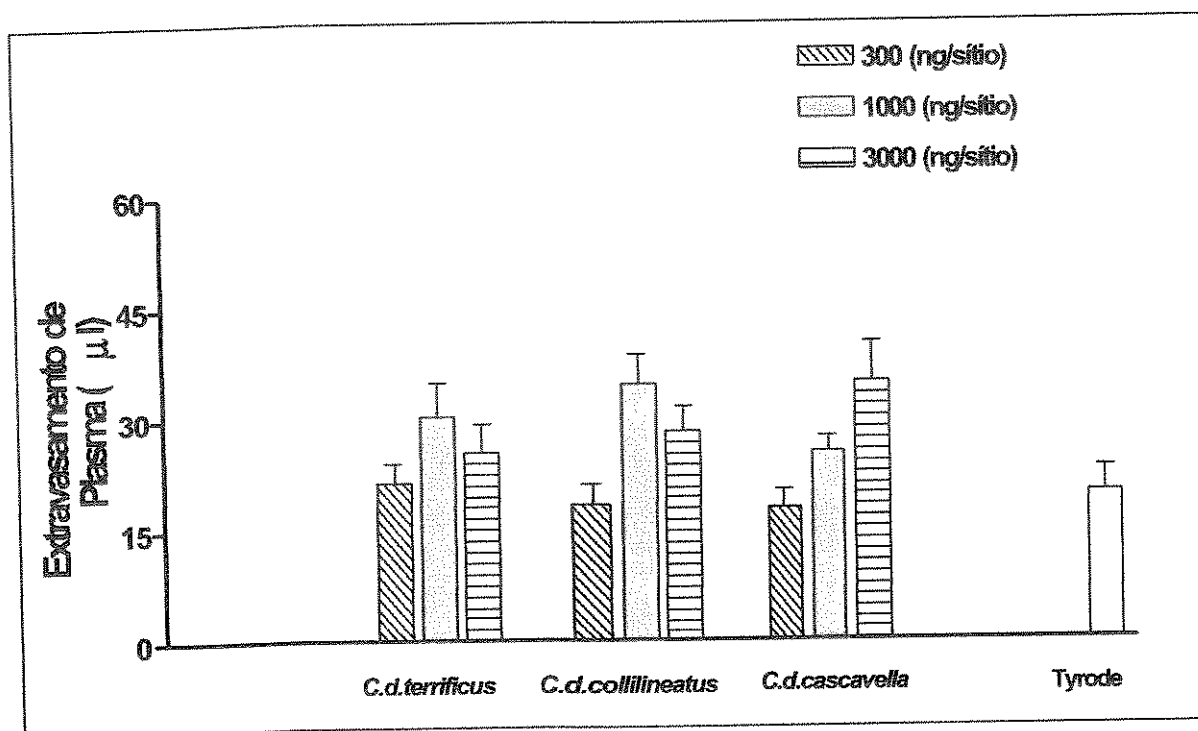


Figura 3.4. Extravasamento plasmático induzido pelas crotapotinas (CA) de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* em pele dorsal de ratos. O extravasamento causado pelo veículo está representado na barra sem preenchimento. Os valores estão representados como média $\pm$ E.P.M. para 5 animais.

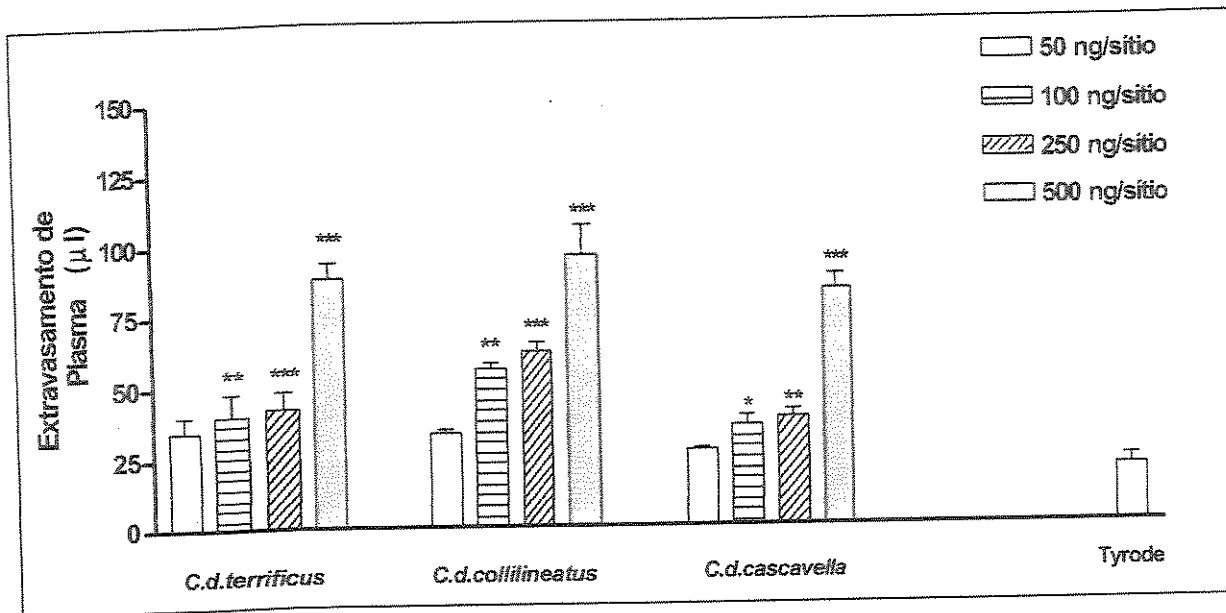


Figura 3.5. Extravasamento plasmático induzido pelas fosfolipases A_2 (PLA $_2$) de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* em pele dorsal de ratos. O extravasamento causado pelo veículo está representado na barra sem preenchimento. Os valores estão representados como a média $\pm$ E.M.P. para 5 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao veículo.

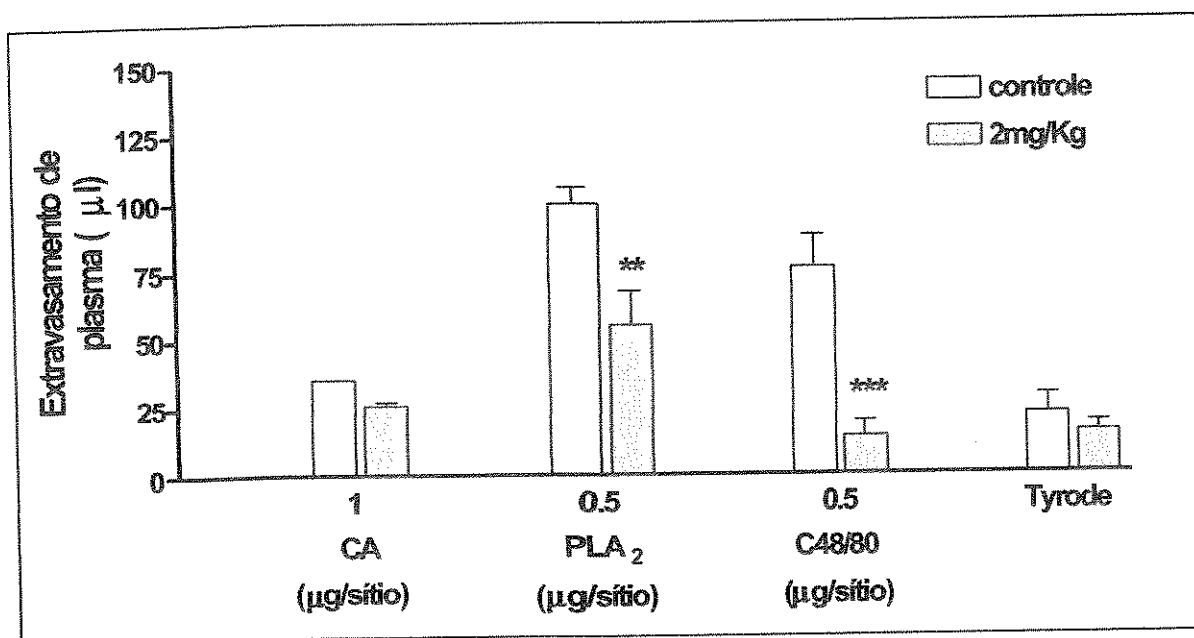


Figura 3.6. Efeito do tratamento com antagonista de receptor de histamina e 5-HT, ciproheptadina (2 mg/kg; i.p.) em ratos no edema induzido por CA e PLA₂ do veneno de *C.d.terrificus*. Os valores estão representados como média ± E.P.M. para 5 animais de cada grupo. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado aos ratos não tratados.

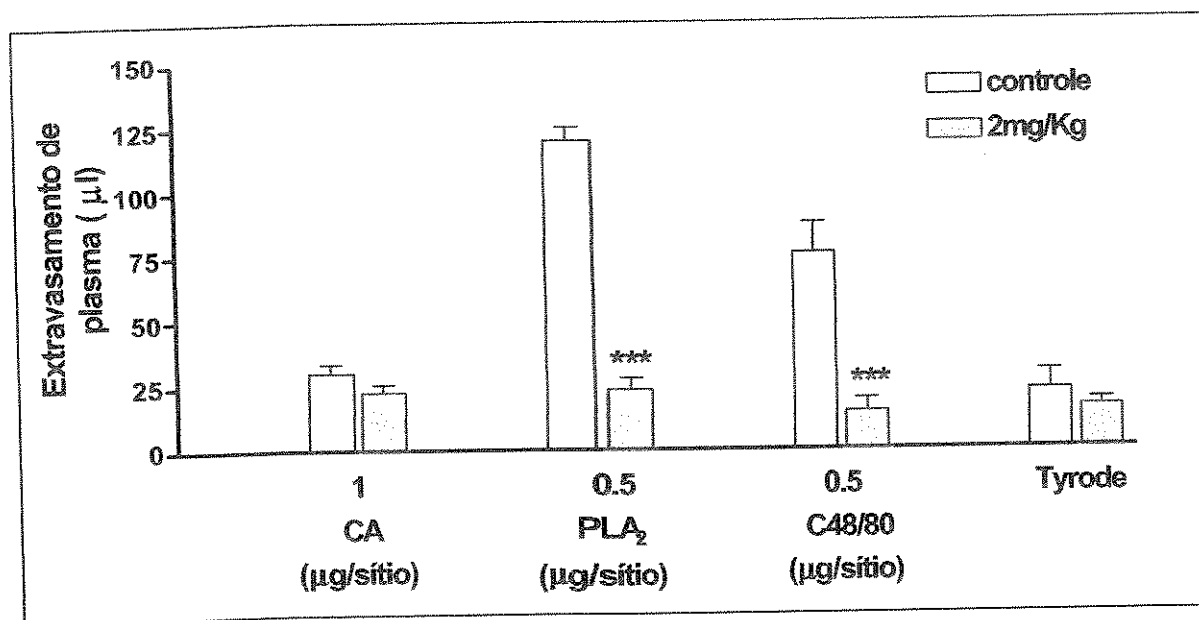


Figura 3.7. Efeito do tratamento com antagonista de receptor de histamina e 5-HT, ciproheptadina (2 mg/kg; i.p.) em ratos no edema induzido por CA e PLA₂ do veneno de *C.d.collilineatus*. Os valores estão representados como média ± E.P.M. para 5 animais de cada grupo. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado aos ratos não tratados.

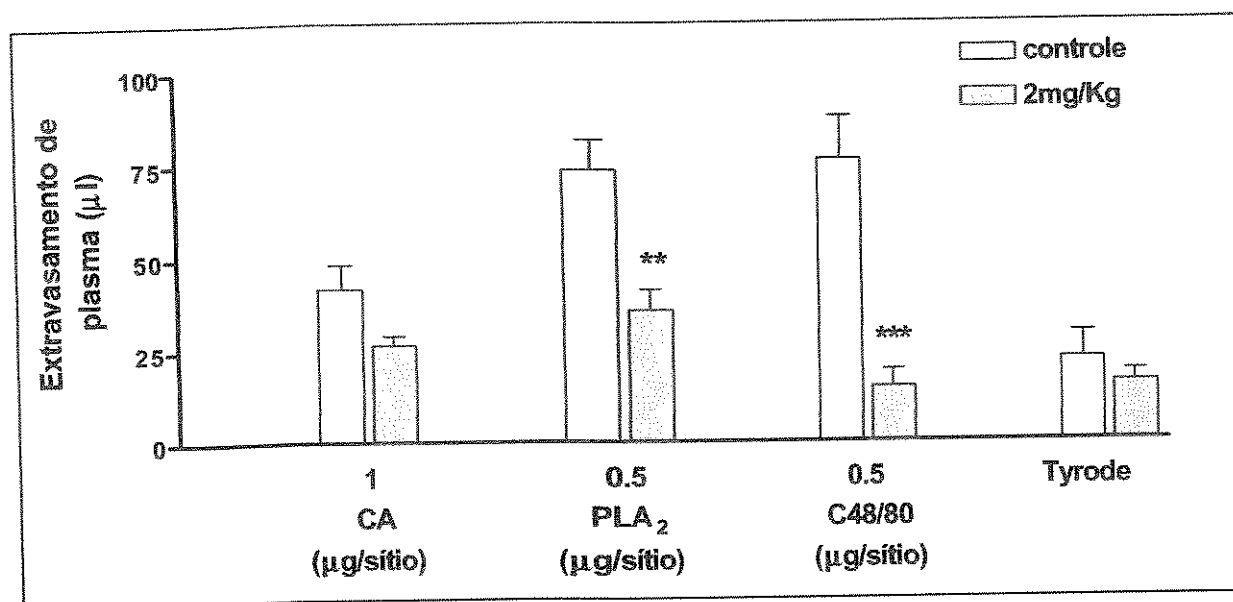


Figura 3.8. Efeito do tratamento com antagonista de receptor de histamina e 5-HT, ciproheptadina (2 mg/kg; i.p.) em ratos no edema induzido por CA e PLA₂ do veneno de *C.d.cascavella*. Os valores estão representados como média $\pm$ E.P.M. para 5 animais de cada grupo. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado aos ratos não tratados.

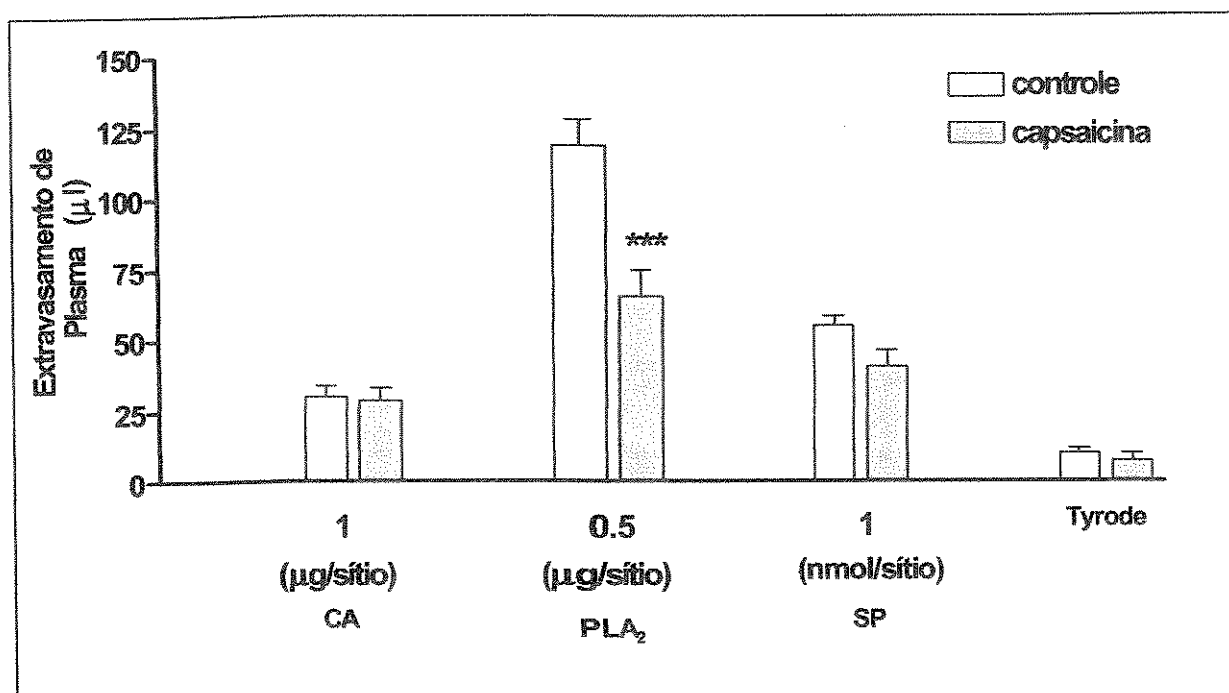
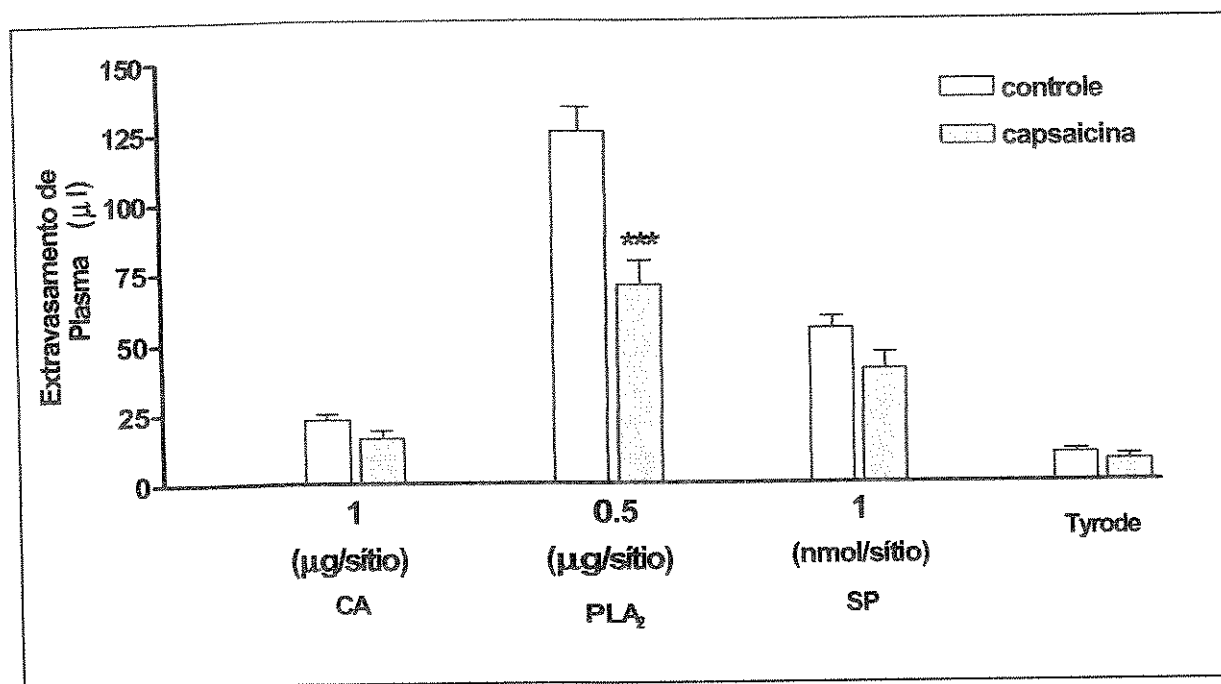


Figura 3.9. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina (50 mg/Kg; i.d.) em ratos no edema induzido por CA e PLA₂ do veneno de *C.d.terrificus*. Os valores estão representados como média ± E.P.M. para 5 animais. *** $p<0,001$ comparado ao grupo de ratos controle.



Figuras 3.10. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina (50 mg/Kg; i.d.) em ratos no edema induzido por CA e PLA₂ do veneno de *C.d.collilineatus*. Os valores estão representados como média ± E.P.M. para 5 animais. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo de ratos controle.

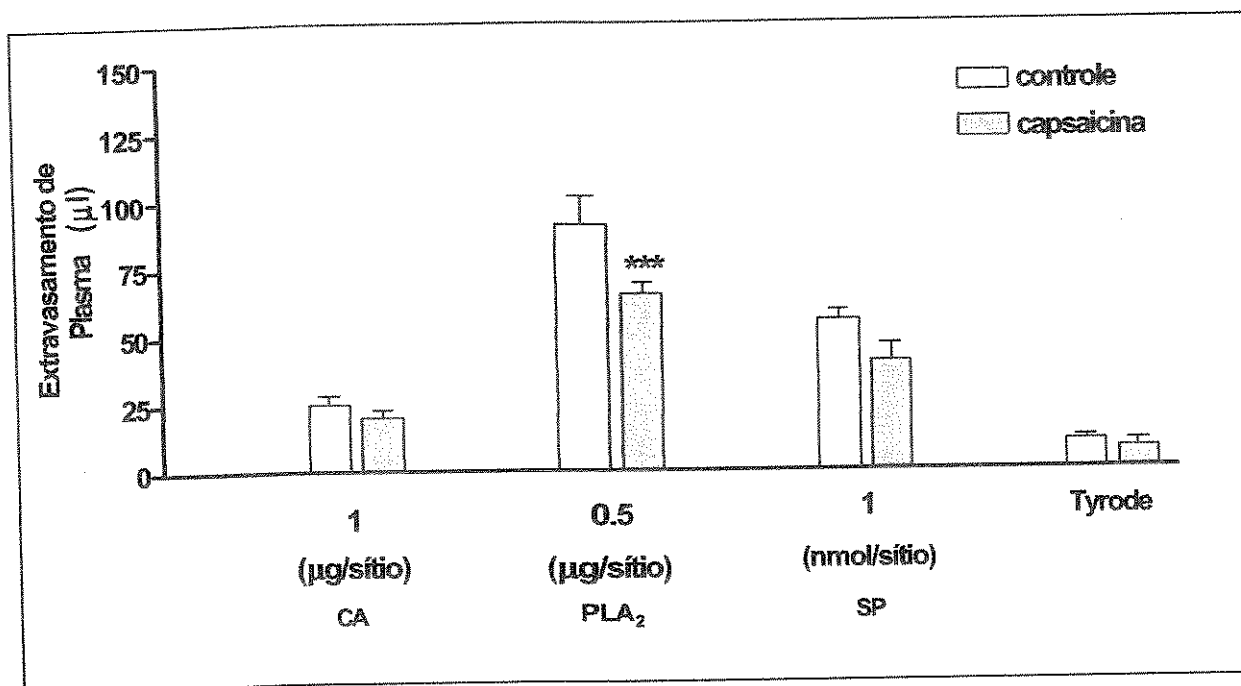


Figura 3.11. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina (50 mg/Kg; i.d.) em ratos no edema induzido por CA e PLA₂ do veneno de *C.d.cascavella*. Os valores estão representados como média $\pm$ E.P.M. para 5 animais. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo de ratos controle.

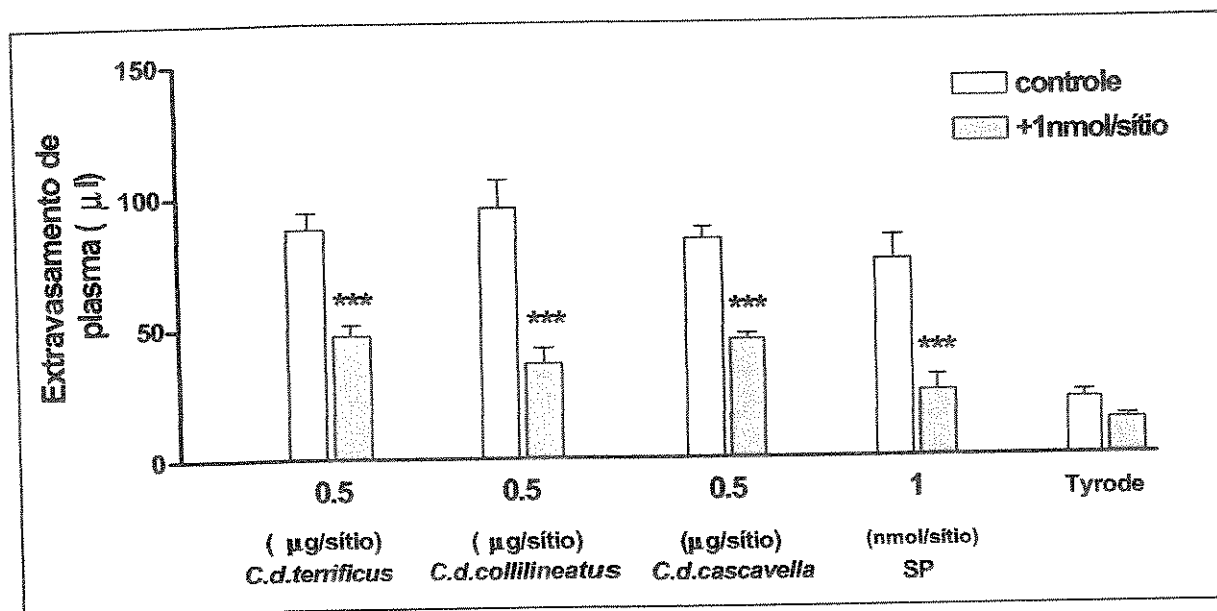


Figura 3.12. Efeito da co-injeção das PLA₂ de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* e da taquicinina (SP) com antagonista de receptor NK₁ de taquicininas, SR140333 (1nmol/sítio). Os valores estão representados como média ± E.P.M. para 5 animais de cada grupo. *** $p < 0,001$ comparado para os venenos na ausência do SR140333.

DISCUSSÃO

4.1- Purificação e Caracterização bioquímica

Neste estudo, as metodologias empregadas na purificação das crotoxinas e isoformas de crotapotinas e PLA₂ presentes nos venenos totais de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* consistem de cromatografia de exclusão em LC e cromatografia de fase reversa em HPLC usando coluna μ -Bondapack C 18, onde conseguimos uma redução dos passos cromatográficos, otimização do material e recuperação das frações sem perda da atividade biológica.

As metodologias empregadas na purificação da crotoxina e de suas subunidades (crotapotina e PLA₂) diferem das descritas por Breithaupt e col., (1976). Basicamente, a purificação da crotoxina era feita em várias etapas cromatográficas, partindo-se de uma coluna convencional de Sephadex G-75, para CM-celulose e em seguida para a purificação das isoformas em sistemas de troca iônica em FPLC (mono Q, mono S). Faure e Bon (1988) conseguiram purificar várias isoformas de crotoxina, utilizando 16 etapas cromatográficas.

Sabe-se que as metodologias até então utilizadas para purificação destas proteínas não eram capazes de separar isoformas de crotoxina presentes no veneno, tomando a cristalização dessas proteínas, bem como trabalhos mais refinados de caracterização biológica e farmacológica, extremamente difíceis.

O surgimento de novas perspectivas só foi conseguido graças a proteínas altamente purificadas, que foram obtidas do veneno total e da crotoxina de *C.d.terrificus*. As técnicas utilizadas para se conseguir estas proteínas, com alto grau de homogeneidade molecular, vêm de trabalhos desenvolvidos desde 1994 (Landucci e col., 1994) usando-se basicamente técnicas de HPLC para purificação de proteínas de serpentes. A partir de 1995, (Toyama e col.) demonstram uma nova metodologia simplificada de purificação de PLA₂ do veneno de serpentes bothrópicas, reduzindo duas etapas cromatográficas para uma única etapa. Com o desenvolvimento desta metodologia, conseguiu-se em um período de dois a três anos, determinar a seqüência primária completa de quatro PLA₂ de *Bothrops*.

Valente e col., (1998) utilizando metodologias semelhantes sobre estudos de purificação das isoformas de PLA₂ da crotoxina de *C.d.terrificus* e de seus efeitos em

mitocôndrias isoladas de fígado de rato, conseguiu obter uma forma de crotapotina (c) e três isoformas de PLA₂ (F1, F2 e F3).

O fracionamento do veneno total de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* em coluna Superdex G-75 mostrou a presença de quatro picos principais que foram identificados como convulxina (pico I), giroxina (pico II), crotoxina (pico III) e crotamina (pico IV).

Santoro e col. (1999) mostraram que os venenos de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* apresentam grande similaridade entre si, tanto bioquimicamente como biologicamente.

Apesar da crotoxina ter sido purificada e caracterizada em 1938 por Slotta & Fraenkel-conrat (1938), a compreensão de sua estrutura e o isolamento de suas subunidades só foram estabelecidas a partir de 1976 (Fraenkel-conrat & Hsiang, 1980) e a determinação da sequência de aminoácidos da cadeia básica da crotoxina (PLA₂) foi concluída em 1990 (Aird e col., 1986 e 1990).

Segundo Lennon & Kaiser (1990), a crotoxina “like” de *C.d.collilineatus* possui alta homologia com a crotoxina isolada de *C.d.terrificus*, apresentando mobilidade eletroforética, toxicidade e estabilidade similar com a crotoxina.

De acordo com Faure & Bon (1988), a crotoxina é o resultado da associação de duas subunidades, uma ácida (Crotapotina) e uma básica (PLA₂), que podem originar-se de um único gen comum ou de vários genes que originariam as PLA₂ e as crotapotinas. Estas subunidades se associariam de forma aleatória dando origem a dois grandes grupos de crotoxina: uma cataliticamente mais ativa e a outra mais neurotóxica. A união destas duas subunidades é mantida basicamente por forças eletrostáticas e hidrofóbicas.

Nossos resultados indicam que as crotapotinas e PLA₂ isoladas dos venenos totais de *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* possuem propriedades bioquímicas e biológicas similares as de *C.d.terrificus*.

O perfil cromatográfico em HPLC de fase reversa mostrou que a crotoxina de *C.d.terrificus* contém duas isoformas de crotapotinas (F6 e F7), contudo a crotoxina de *C.d.collilineatus* mostrou a presença de quatro isoformas de crotapotina, sendo duas

majoritárias (F3, F4) (Ponce-Soto e col., 2002). Este perfil foi semelhante ao da purificação da crotoxina de *C.d.cascavella* (Beghini e col., 2000).

A análise em HPLC de fase reversa mostrou também que as crotoxinas dos venenos totais de *C.d.cascavella* quanto *C.d.collilineatus* possuem apenas uma única isoforma de PLA₂ (F6), enquanto que a crotoxina do veneno total de *C.d.terrificus* mostrou três isoformas (F15, F16 e F17).

A análise dos perfis eletroforéticos mostrou que os venenos *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella*, bem como de suas crotoxinas, PLA₂ e crotapotinas isoladas possuem mobilidade e disposição de bandas eletroforéticas muito semelhantes entre si, onde a crotoxina apresenta-se com uma banda de 26 kDa e as PLA₂ e as crotapotinas com uma massa molecular de 15 kDa e 9 kDa, respectivamente. Resultados semelhantes também foram encontrados por Lennon e Kaiser (1990) em relação ao perfil eletroforético entre as crotoxinas de *C.d.terrificus* e *C.d.collilineatus*.

4.2- Atividade Farmacológica

Neste estudo, demonstramos que as PLA₂s de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e de *C.d.cascavella* (0.5 µg/sítio), mas não as crotapotinas (1 µg/sítio), causam aumento significativo na permeabilidade microvascular em pele dorsal de ratos. Estudos prévios foram realizados com doses de 0.5, 1.0 e 1.5 µg/sítio para as três PLA₂s crotálicas e demonstraram não haver diferença significaviva do extravasamento plasmático após a dose de 0.5 µg/sítio. Essas substâncias quando comparadas entre si, apresentam similar capacidade de induzir extravasamento de proteína.

Fosfolipases A₂ secretadas (sPLA₂) têm sido identificadas em doenças inflamatórias humanas como a artrite reumatóide (Pruzanski e col., 1988), psoríases (Andersen e col., 1994), septicemia por gram-negativas (Vadas, 1994), pancreatite aguda (Formela e col., 1995) e outras (Hurt-Camejo & Camejo, 1997). Em condições experimentais, a administração de sPLA₂ purificadas de venenos de serpentes ou de pâncreas porcino, normalmente leva a uma reação inflamatória local caracterizada principalmente por desgranulação de mastócitos, aumento na permeabilidade vascular

e formação de edema (Lomonte e col., 1993; Moreno, 1993; Lau & Roche, 1997; Chaves e col., 1998).

Estudos recentes demonstraram que sPLA₂ isoladas de venenos de serpentes causam a formação de edema local em ratos, resultando na liberação de substâncias vasoativas incluindo histamina e 5-HT, prostaglandinas e cininas (Osaka, 1989). Embora o mecanismo de ação destas sPLA₂ ainda seja controverso, seus efeitos pró-inflamatórios são dependentes principalmente de sua atividade catalítica (Cirino e col., 1989; Moreno e col., 1992).

Atualmente, sabe-se que a habilidade dos inibidores da atividade da PLA₂ em suprimir a liberação de histamina é independente de qualquer um dos produtos da ciclooxigenase ou lipooxigenase (Cirino e col., 1989), dando suporte ao conceito de dissociação entre atividade catalítica e de desgranulação. Alternativamente, a Histidina-48 (His-48) pode ser importante para a expressão da atividade farmacológica da PLA₂, independente da integridade de seu sítio catalítico (Diaz e col., 1993).

Landucci e col. (2000) sugerem que a atividade edematogênica das sPLA₂ não está necessariamente ligada à atividade catalítica destas enzimas, uma vez que o edema induzido pela PrTX-I, uma Lisina-49 (Lis-49) desprovida de atividade enzimática e isolada do veneno de *Bothrops pirajai*, foi marcadamente reduzido pelo *p*-BPB, um agente que inibe a atividade enzimática da PLA₂ pela alquilação do resíduo de His-48 localizado no seu sítio ativo (Denis, 1987), e pelo uso do antagonista de receptores de histamina e 5-HT, ciproheptadina. Os autores sugerem que o efeito da PrTX-I parece ser decorrente de um possível sítio farmacológico presente nesta sPLA₂, formado principalmente por cargas catiônicas distribuídas na molécula, sendo uma delas formada pelo resíduo de His-48. Desde que membranas plasmáticas de diferentes tipos celulares (incluindo mastócitos) contêm sítios aniônicos fixos constituídos principalmente por glicosaminoglicanos sulfatados (Schwartz, 1994), acredita-se que a ativação de mastócitos por polications acontece pela interação eletrostática entre estes e os sítios aniônicos na superfície dessas células.

Interessantemente, os mastócitos expressam e liberam PLA₂ do tipo II, a qual pensava-se modular a desgranulação dos mesmos (Murakami e col., 1993). A participação de mastócitos nas respostas mediadas pelas isoformas de crotapotinas e

PLA₂ crotálicas em pele dorsal de ratos foi avaliada através do uso do antagonista de receptores de histamina e 5-HT, ciproheptadina. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento dos animais com a ciproheptadina reduziu o extravasamento plasmático induzido pelas PLA₂s de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e de *C.d.cascavella*, sugerindo que o edema resultante da ação dessas isoformas envolve ativação local de mastócitos. O edema induzido pelo composto 48/80 foi reduzido de maneira significativa ($p < 0,001$) nos animais tratados com ciproheptadina, confirmando então a eficácia do tratamento.

Landucci e col. (1998) demonstraram que a ciproheptadina foi capaz de inibir completamente a formação de edema em pata e pele de ratos induzida pela BthTX-I, uma PLA₂ Lis-49 sem atividade fosfolipásica A₂ e pela BthTX-II, uma PLA₂ Asp-49 com baixa atividade catalítica e isoladas do veneno de *Bothrops jararacussu*, provando que elas são capazes de aumentar a permeabilidade microvascular em ratos por um mecanismo envolvendo a desgranulação de mastócitos, semelhantemente à PrTX-I de *Bothrops pirajai*.

Desde que sPLA₂ podem ativar fosfolipases A₂ citosólicas (cPLA₂) as quais atuam catalisando a hidrólise dos fosfolipídeos de membrana (Huwiler, 1997), e as PLA₂ crotálicas possuem atividade catalítica, nós não podemos excluir a possibilidade de que o edema induzido pelas PLA₂s crotálicas pode ser uma consequência da geração de mediadores quimiotáticos como os leucotrienos B₄ e PAF.

Além disso, De Castro e col., (2000) demonstraram que a capacidade da PrTX-I de *Bothrops pirajai* e BthTX-I e BthTX-II de *Bothrops jararacussu* em recrutar leucócitos bem como a desgranulação de mastócitos dentro da cavidade pleural de ratos envolve mecanismos não relacionados com a atividade enzimática.

A ativação dessas células pelas isoformas de PLA₂ crotálicas poderia ocorrer através de um mecanismo indireto, uma vez que mastócitos estão localizados próximos de vasos sanguíneos, epitélio, músculo liso (ou em contato direto) com as terminações nervosas sensoriais periféricas (Marshall & Wasserman, 1995), ou seja, a estimulação de fibras sensoriais poderia levar à desgranulação dos mesmos (Dimitriadou e col., 1991). Adicionalmente, a própria histamina é capaz de ativar os terminais sensoriais amplificando a resposta inflamatória (Sufka e col., 1991; Amman e col., 1995).

Existem evidências que sugerem o envolvimento de terminações nervosas sensoriais na produção de inflamações localizadas. A ativação das mesmas leva à liberação de neuropeptídeos que iniciam a reação inflamatória. Acredita-se que existem fibras na raiz dorsal que, quando estimuladas antidromicamente, produzem vasodilatação da pele por um mecanismo que não envolve o sistema nervoso autônomo (Bayliss, 1901 e Bruce, 1913). A partir daí, concluiu-se que a vasodilatação provocada por impulsos nervosos que se propagavam no sentido eferente das fibras nervosas sensoriais, promove a liberação de substâncias vasoativas tais como a substância P e CGRP (calcitonin gene related peptide; Holzer, 1992).

Postula-se que a interação de substâncias liberadas de mastócitos (histamina e 5-HT) com outros mediadores inflamatórios, tais como substância P, é um passo intermediário no desencadeamento de processos inflamatórios neurogênicos (Holzer, 1992). Além disso, sugere-se que a histamina e 5-HT possuam seus próprios receptores localizados em terminais nervosos sensoriais (Holzer, 1998). Sabe-se ainda que o aumento na permeabilidade vascular evocado pela substância P é mediado por dois mecanismos distintos: estimulação direta dos receptores NK₁, localizados nas células endoteliais de vênulas pós-capilares, e ativação de mastócitos (Brain & Willians, 1989). Estudos recentes revelam que receptores NK₁ estão expressos em mastócitos de ratos (Ogawa e col., 1999) e camundongos (Krumins & Broomfield, 1992), sugerindo que a substância P desgranula mastócitos via ativação direta desses receptores. Partindo-se desse princípio, decidimos investigar a atividade edematogênica das isoformas de PLA₂ crotálicas em animais co-injetados com o antagonista de receptores NK₁ de taquicininas, SR140333.

Nossos resultados demonstraram que a co-injeção das isoformas de PLA₂ crotálicas com o SR140333 inibiu significativamente ($p < 0,001$) o extravasamento plasmático evocado pelas mesmas. O edema induzido pelas PLA₂ de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella*, assim como o edema evocado pelo agonista de receptor NK1 de taquicicinas, substância P foi marcadamente reduzido ($p < 0,001$), confirmando então a eficácia da co-injeção.

Dessa forma, nossos resultados indicam que o extravasamento plasmático induzido pelas isoformas crotálicas é parcialmente dependente da estimulação de

receptores NK₁ de taquicininas e, portanto, possui um componente neurogênico, visto que receptores NK₁ estão de fato implicados nas ações pró-inflamatórias da substância P (Quartana & Maggi, 1998).

A capsaicina é bastante empregada como instrumento de pesquisa na investigação de processos inflamatórios neurogênicos (Holzer, 1991). Isto se deve ao fato da capsaicina possuir a capacidade de estimular ou degenerar subtipos de neurônios sensoriais levando à liberação ou depleção de neuropeptídeos, tais como a substância P e CGRP (Jancsó e col., 1977). Quando administrada em ratos no período neonatal, a capsaicina degenera os neurônios localizados no gânglio da raiz dorsal causando lesão do terminal sensorial e depleção crônica dos neuropeptídeos. Assim, o tratamento de ratos com capsaicina no período neonatal causou redução significativa no extravasamento plasmático induzido pelas isoformas de PLA₂ crotálicas ($p < 0,001$), enquanto que o edema evocado pelo agonista de receptor NK₁ de taquicininas, substância P não sofreu alteração significativa, confirmando então a eficácia do tratamento.

Gonçalves & Mariano (2000) sugerem que a hemorragia local induzida pela injeção subplantar, em camundongos, do veneno de *Bothrops jararaca* é parcialmente mediada por serotonina e mediadores neurohumorais, ao observarem uma redução da hemorragia local após o pré-tratamento com capsaicina. Esses mesmos autores também observaram uma intensa desorganização de fibras colágenas após a injeção do veneno, particularmente em regiões próximas a vasos e nervos, assim como mastócitos foram desgranulados e eritrócitos foram vistos saindo através de vênulas nas junções endoteliais.

Apesar de numerosos estudos realizados, as bases moleculares para a ação farmacológica seletiva e específica das PLA₂ ainda não estão claras. É possível que tanto a hidrólise dos fosfolípidios como a ligação a um receptor específico para PLA₂ na superfície celular sejam requeridos para um efeito farmacológico particular. A cerca de 10 anos atrás, Kini & Evans (1989) propuseram um modelo para explicar os diferentes efeitos farmacológicos das PLA₂. Este modelo era baseado na presença de sítios ligantes específicos localizados na superfície de células alvo os quais tinham alta afinidade por PLA₂ específicas, mas não por PLA₂ não-específicas.

Em apoio a este modelo, usando sPLA₂ neurotóxicas do veneno de serpentes OS₁(*Oxyuranus scutellatus* PLA₂-1) e OS₂ (*Oxyuranus scutellatus* PLA₂-2) como ligante radiomarcado, Valentin et al (2000), identificaram dois tipos de receptores chamados tipo-N (neuronal) e tipo-M (músculo). Vários ligantes com alta afinidade foram identificados em locais de ligação para outras sPLA₂ neurotóxicas, inclusive para a crotoxina (Hseu e col., 1999). Estes dois receptores são estruturalmente e farmacologicamente distintos. Os receptores de tipo-N estão presentes em membranas de cérebro de rato e os receptores de tipo-M estão presentes em membranas celulares de músculo esquelético de coelhos (Valentin e col., 2000). Semelhantes receptores de alta afinidade, mas não idênticos (tipo-N-like) para os receptores de tipo-N de cérebro foram achados em vários tecidos como pulmão, fígado, coração e rim, sugerindo a existência de uma diversidade de receptores de tipo-N em tecidos diferentes (Nicolas e col., 1997). Contudo, estes receptores não foram clonados, e a estrutura molecular e o papel fisiológico destes ligantes endógenos ainda são desconhecidos.

Nossos resultados fornecem evidências diretas de que o edema evocado pelas PLA₂ crotálicas envolve a participação de receptores de taquicinas NK₁, neurônios sensoriais e mastócitos. Nossos dados sugerem que as isoformas de PLA₂ crotálicas possuem dois mecanismos distintos: estimulação direta dos terminais nervosos sensoriais via receptores tipo-N para PLA₂ presentes nestes, resultando na liberação de substância P e estimulação indireta de mastócitos pela substância P via receptores NK₁ de taquicinas, promovendo a liberação de histamina e 5-HT.

Entretanto, não podemos excluir a possibilidade de que o edema formado pelas PLA₂ crotálicas pode ser também uma consequência da liberação de outros mediadores vasoativos, uma vez que a substância P promove a liberação uma variedade de agentes endógenos de macrófagos (íons superóxidos, prostanóides) e estimula a migração de macrófagos (Hartung e col., 1986) e leucócitos polimorfonucleares (Hartung & Toyka, 1989).

No cérebro, a substância P promove a secreção de Interleucina-1 (Martin e col., 1992) ou potencializa a liberação de citocinas nas células microgliais de ratos neonatos tratados com lipopolissacarídeos (Martin e col., 1993). A substância P pode, portanto,

desempenhar um papel de mediador nas respostas imunológicas e inflamatórias em cérebro de humanos e de animais.

Por isso, a possibilidade de que o edema formado pelas PLA₂ crotálicas pode ser também uma consequência da liberação de outros mediadores vasoativos não está excluída e estudos futuros envolvendo o mensuramento dos níveis desses mediadores no extravasamento plasmático induzido pelas PLA₂ de *C.d.terrificus*, *C.d.colliilineatus* e *C.d.cascavella* poderiam ajudar a clarear essas hipóteses.

CONCLUSÃO

- 1- Os perfis cromatográficos demonstraram similaridade das três frações crotoxínicas dos venenos de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* e a eletroforese também foi compatível quanto às regiões de massa molecular esperadas para as frações (Crtx,CA,PLA₂) das três espécies.
- 2- As PLA₂ , mas não as crotapotinas, de *C.d.terrificus*, *C.d.collilineatus* e *C.d.cascavella* causam aumento significativo na permeabilidade microvascular em pele dorsal de ratos.
- 3- O extravasamento protéico na pele de ratos induzido pelas PLA₂ das três espécies crotálicas é decorrente da ativação de mastócitos, bem como da ativação de terminais nervosos sensoriais, resultando na liberação de agonistas de receptores NK₁ de taquicininas, provavelmente a substância P.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

- Ackermann EJ, Kempner ES, Dennis E.A., 1994. Ca²⁺-independent cytosolic phospholipase A₂ from macrophage-like P388D1 cells: isolation and characterization. *J Biol Chem*: 269:9227-33.
- Aird, S.D., Kaiser, I.I., Lewis, R.V., Kruggel, W.G., 1986. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 296-300.
- Aird, S.D., Yates, I.I.I., J.R., Martin, P.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Kaiser, I.I., 1990. The amino acid sequence of the acid subunit β -chain of crotoxin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1040: 217-224.
- Amman, R., Schuligoi, R., Lanzi, I. & Donnerer, J., 1995. Histamine-induced oedema in rat paw—effect of capsaicin denervation and CGRP receptor antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, 279: 227-231.
- Andersen, S., Sjørnsen, W., Laegreid, A., Volden, G., Johansen, B., 1994. Elevated expression of human nonpancreatic phospholipase A₂ in psoriatic tissue. *Inflammation* 18, 1-12.
- Arbibe, L., Koumanov, K., Vial, D., Rougeot, C., Faure, G., Havet, N., Longrace, S., Vargaftig, B.B., Bérézat, G., Voelker, D.R., Wolf, C., Touqui, L., 1998. Generation of lyso-phospholipids from surfactant in acute injury is mediated by type-II phospholipase A₂ and inhibited by a direct surfactant protein A-phospholipase A₂ protein interaction. *J. Clin. Invest.* 102: 1152-1160.
- Baluk, P., 1997. Neurogenic inflammation in skin and airways. *J. invest. Dermatol Symp. Proc.*, 2: 76-81.
- Baylis, W.M., 1901. The origin from the spinal cord of the vasodilator fibres of the hind limb, and on the nature of these fibres. *J. Physiol.*, 26: 173-209.
- Beghini DG, Toyama MH, Hyslop S, Sodek L, Novello JC, Marangoni S., 2000. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (Maracaboia) venom. *J. Protein. Chem* 19 (7): 603-7.
- Bon. C. Teng, T.W., 1979. Crotoxin: a possible mechanism of action. *Adv Cytopharmacol* 3: 231-235.

- Bouchier, C., Boulain, J.C., Bon, C. and Menez, A. (1991). Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A₂-like precursor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1088(3):401-408
- Brain, S.D. & Willians, T.J., 1989. Interaction between the tachykinins and calcitonin gene-related peptide lead to the modulation of oedema and blood flow in rat skin. *Br. J. Pharmacol.*, 97:77-82.
- Brain, S.D. and Cambridge, H., 1996. Calcitonin gene-related peptide: vasoactive effects and potential therapeutic role. *Gen. Pharmacol.*, 27: 607-611.
- Breithaupt, H. ,1976. Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A₂ and the crotoxin complex. *Toxicon* 14 (3):221-33.
- Bruce, A.N., 1913. Vasodilatador axon reflex. *Q.J.Physiol.*, 6: 339-354.
- Capper E. A., Marchal, L A. I. (2001). Mammalian phospholipase A₂: mediators of inflammation, proliferation and apoptosis. *Progress in Lipid Research* 40 ;167-197.
- Chavez, F., Barboza, M. and Gutiérrez, 1995. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* 33, 31-39.
- Chavez, F., Leon, G., Alvarado, V.H., Gutiérrez, J.M., 1998. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and asp-49 myotoxic phospholipases A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 36, 1861-1869.
- Chen Y, Dennis EA., 1998. Expression and characterization of human group V phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta*; 1394: 57-64.
- Cirino, G., Peers, S.H., Wallace, J.L., Flower, R.J., 1989. A study of phospholipase A₂-induced oedema in rat paw. *Eur.J. Pharmacol.* 166, 505-510.
- Conde, R., Zamudio, F.L., Becerril, B., Possani, L.D., 1999. Phospholipin, a novel heterodimeric phospholipase A₂ from *Pandinus imperator* scorpion venom, *FEBS Lett.* 460: 447-450.

- Cupillard, L., Koumanov, K., Mattei MG, Lazdunski, M., Lambeau, G., 1997. Cloning, chromosomal mapping and expression of a novel human secretory phospholipase A₂. *J. Biol. Chem* 272:15745-52.
- De Castro, R.C., Landucci, E.C.T.; Toyama, M.H; Marangoni, S.; Giglio, J.R., Antunes, E. and Nucci, G. , 2000. Leucocyte recruitment induced by type II Phospholipase A₂ into the rat pleural cavity. *Toxicon* 38 : 1773-1785.
- Dennis E.A. ,1994. Diversity of Group Types, Regulation and function of Phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 269 (18): 13057-13060.
- Dennis E.A., 1998. The growing Phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes, *TIPS* 22: 1-2.
- Dennis, E.A., 1987. Regulation of eicosanoid production:Role of Phospholipase and inhibitors. *BioTechnology* 5: 1294-1300.
- Dennis, E.A., 1997. The growing Phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes *Trends Biol. Sci.* 22: 1-2.
- Diaz, C., Gutierrez, J.M., Lomonte, B., Nunez, J., 1993. p-bromophenacyl bromide modification of Bothrops asper myotoxin II, a lysine-49 Phospholipase A₂, effects its pharmacological activities. *Toxicom* 31, 1202-1206.
- Dimitriadou, V., Buzzi, M.G., Moskowitz, M.A. & Theoharidae, T.C., 1991. Trigeminal sensory fiber stimulation induces morphological changes reflecting secretion in rat dura mater mast cells. *Neuroscience*, 44 : 97-112.
- Edelson, J.D., Vadas, P., Villar, J., Muller, J. B. M. And Pruzanski, W.,1991. Acute lung injury induced by phospholipase A₂. Structural and functional changes. *Am. Rev. Resp. Dis.* 143, 1102-1109.
- Edmonds-Alt, X., Vilain, P., Goulaouic, P., Proietto, V., Van Broeck, D., Advenier, C., Naline, E. Neliat, G., Lçe Fur, G., Breliere, J.C.,1992. A potent and seletive non-peptide antagonist of the neurokinin A (NK2) receptor. *Life Sci.* 50: PL101- PL106.
- Faure, G. And Bon, C., 1988. Crotoxin, A Phospholipase A₂ neurotoxin from the south america rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Purification of several isoforms

- and a Comparison of their molecular structure and of their biological activities. *Biochemistry*, 27 (2): 730-738.
- Faure, G., Villela, C., Perales, J., Bon, C., 2000. Interaction of the neurotoxic and non-toxic secretory phospholipase A₂ with the crotoxin inhibitor from *Crotalus* serum. *Eur.J. Biochem.* 267: 4799-4808.
- Faure, G., 1999. Les phospholipases A₂ des venins de serpents. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 124: 149-168.
- Faure, G., 2000. Natural inhibitor of toxic phospholipases A₂. *Biochimie* 82: 833-840.
- Faure, G., Choumet, V., Bouchier, C., Camoin, L., Guillaume, J.L., Monegier, B., Vuilhorgne, M. and Bon, C. (1994). The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur J Biochem* 223(1):161-164.
- Faure, G., Guillaume, J.L., Camoin, L., Saliou, B. and Bon, C., 1991. Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. *Biochemistry* 30(32):8074-8083.
- Formela, L.J., Galloway, S.W., Kingsnorth, A.N., 1995. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* 82., 6-13.
- Fortes-Dias, C.L., Lin, Y., Ewell, E., Diniz, C.R., Liu, T.Y., 1994. A phospholipases A₂ inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), *J.Biol. Chem.* 269: 15646-15651.
- Fortes-Dias, J., Fonseca, B.C.B., Kochva, E., Diniz, 1991. Purification and properties of an antivenom factor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon* 29: 997-1008.
- Fraenkel-Conrat, H., Jeng, T.W., Hsiang, H., 1980. Biological activities of crotoxin and aminoacid sequence of crotoxin B. In: Eaker, D & Wadstrom, T. (Editors), *Natural Toxins*. Pergamon Press, Oxford, 561-567.
- Garret, C., Carruette, A., Fardin, V., Moussaoui, S., Peyronel J-F., Blanchard J-C., Laduron, P.M., 1991. Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist. *Proc. Nat. Acad Sci. USA* 88: 10208-12.

- Gross RW , 1998. Activation of calcium independent phospholipase A₂ by depletion of internal calcium stores. *Mol Struct Phospholipids Reg Cell Fune*: 26: 345-9.
- Gutiérrez, J.M. and Lomonte, B. ,1995. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*, 33, 1405-1424.
- Han S-K, Yoon ET, Cho W, 1998 . Bacterial expression and characterization of human secretory class V phospholipase A₂. *Biochem J*; 331: 353-7.
- Hanley, M.R., 1979. Conformation of the neurotoxin crotoxin complex and its subunits. *Biochemistry* 18(9):1681-1688
- Harris, J.B., 1985. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. *Pharmacol. Ther.* 31: 79-102.
- Hartung, H.P., voltors, K., and Toyka, K.V., 1986. Substance P binding properties and studies on cellular responses in guinea pig macrophages. *J. Immunol.* 136:356-3863.
- Hartung, H.P., voltors, K., and Toyka, K.V., 1989. Substance P, the immune system and inflammation. *Int. Rev. Immunol.* 4:229-249.
- Harvey, A.L.; Bradley, K.N.; Cochran, S.A.; Rowan, E.G.; Pratt, J.A.; Quillfeldt, J.A.; Jerusalinsky, D.A. (1998) What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon* 36(11):1635-1640.
- Hawgood, B., Bon, C, in: A.T. Tu (Ed.), *Handbook of Natural Toxins*, vol. 5, Marcel Dekker, New York, 1991: 3-52.
- Hawgood, B., Bon, C., 1991 . *Handbook of natural toxins: Reptile and amphibian venoms*, vol. 5, in: Tu A.T. (Ed.), Marcel Dekker, New York: 3-52.
- Hawgood, B.J., 1989. How similar are the actions of crotoxin and beta-bungarotoxin? *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 39(4):397-406.
- Hendon, R.A., Fraenkel-Conrat, H., 1971. Biological role of the two components of crotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 1560-1563.
- Hoffman, D.R., Jacobson R.S., 1996. Allergens in Hymenoptera venom. XXVII: bumblebee venom allergy and allergens, *J. Allergy Clin. Immunol.* 97 : 812-821.

- Holzer, P, 1991. Capsaicin: cellular targets, mechanism of action, and selectivity for thin sensory neurones. *Pharmacol Rev.*,43: 143-198.
- Holzer, P, 1992. Peptides sensory neurons in the control of vascular function: mechanisms and significance in the cutaneous and vascular splanchnic beds. *Ver. Physiol. Biochem. Pharmacol.*121 : 52-145.
- Holzer, P, 1998. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen Pharmac.*,30: 5-11.
- Hseu, M.J., Yen, C.H., Tzeng, M.C., 1999. *FEBS Lett.* 445: 440-444.
- Hurt-Camejo, E., Camejo, G., 1997. Potential involvement of type II phospholipase A₂ in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 11, 1-8.
- Huwiler, A., Staudt, G., Kramer, R.M., Pfeilschifter, J., 1997. Cross-talk between secretory phospholipase A₂ and cytosolic phospholipase A₂ in rat renal mesangial cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1348, 257-272.
- Iwanaga, S. & Susuki, T, 1972. Enzymes in snake venom. In:Snake venoms. Chen Yuan Lee. Ed. Springer-Verlag Flidelberg. New York. Pg 61-158.
- Jancsó, G., Kiraly, E., Jankos-Gabor, A., 1977. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* 270: 741-742.
- Kini, R.M., 1997. Venom phospholipases A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism, John Willey & Sons Ltd, UK:1-28.
- Kini, R.M., Evans, H.J., 1989. A model to explain the pharmacologic effects of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* 27:613-635.
- Kordis,D., Bdolah, A., Gubensek, F., 1998. *Bioch. Biophys. Res. Commun* 251:613-619.
- Kouyoumdjian, J. A. 1986. Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. *Toxicon* 24, 575-583.
- Krizaj, I, Faure, G., Gubensek, F., Bom, C., 1997. Neurotoxic phospholipase A₂ ammodytoxin and crotoxin bind to distinct high- affinity protein acceptors in *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochemistry* 36. 2779-2787.

- Krumins, S.A. & Broomfield, C.A., 1992. Evidence of NK₁ and NK₂ tachykinin receptors and their involvement in histamine release in a murine mast cells line. *Neuropeptides*, 21 : 65-72.
- Lambeau, G, Lazdunski M., 1999. Receptors for a growing of secreted Phospholipase A₂. *Trends Farmacol. Sci.* 20: 162-170.
- Landucci, E.C.T., Condino-Neto, A., Perez, A.C., Hyslop, S., Corrado, A.P., Novello, J.C., Marangoni, S., Oliveira, B., Antunes, E. and de Nucci, G., 1994. Crotoxin induces aggregation of human washed platelets. *Toxicon* 32(2) :217-226.
- Landucci, E. C. T.; Antunes, E.; Donato, J. L.; Faro, R.; Hyslop, S.; Marangoni, S.; Oliveira B.; Cirino, G. and Nucci De G., 1995. Inhibition of Carageenin-Induced rat paw o edema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. *Brithish J. Pharmacol.* , 114: 578-583.
- Landucci, E.C.T., Castro, R.C., Pereira,, M.F., Cintra, A.C.O., Giglio, J.R., Marangoni, S., Oliveira, Cirino, G., Antunes, E. and de Nucci, G., 1998. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: Dissociation between enzymatic and biological activities. *British J Pharmacol.* 343 : 257-263.
- Landucci, E.C.T., Castro, Giglio, J.R., Marangoni, S, Antunes, E. and de Nucci, G., 2000. Inflammatory oedema induced the Lys-49 phospholipase A₂ homologue Piratoxin-I in the Rat and Rabbit. Effect of polyanions and *p*-Bromophenacyl Bromide activities. *Biochemical Pharmacology.* 59: 1289-1294.
- Landucci, E.C.T.; Toyama, M.H; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Cirino, G.; Antunes, E. and Nucci, G. , 2000. Effect of crotapotin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A₂. *Toxicon* 38: 199-208.
- Lau, H.Y., Roche C.M., 1997. effects of secretory phospholipase A₂ enzymes on mast cells of rat, guinea pig and human. *Inflam. Res.* 46, S19-20.
- Lembeck, F. & Holzer, P., 1979. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn- Schmied Arch Pharmac*, 310: 175-183.

- Lennon, B. W., Kaiser II., 1990. Isolation of a crotoxin-like protein from the venom of a south American rattlesnake (*Crotalus durissus collilineatus*). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 97 (40): 695-9.
- Liu, C. S., Chen, J. M., Chang, C. H., Chen, S. W., Teng, C.M. and Tsai, I. H., 1991. The amino acid sequence of an edema-inducing Lys-49 phospholipase A₂ homolog from venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. *Biochem. Physiol. Acta*. 1077, 362-370.
- Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Borkow, G., Ovadia, M., Tarkowisk, A. and Hanson, L. A., 1994. Activity of hemorrhagic toxin BaH-I and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells *in vitro*. *Toxicon* 32, 505-510.
- Lomonte, B., Tarkowisk, A. and Hanson, L. A., 1993. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokine release in mouse model. *Inflammation* 17, 93-105.
- Lotan, A., Fishman, L., Loya, Y., Zlotkin, E., 1995. Delivery of a nematocyst toxin, *Nature* 375: 456.
- Lundberg, J.M., 1996. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol. Rev.*, 48 :114-135.
- Maggi, C.A., 1991. The pharmacology of the efferent function of sensory nerves. *J. Auton. Pharmac.*, 11: 173-208.
- Maggi, C.A., 1995. Tachykinins and calcitonin gene-related peptides (CGRP) as cotransmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog. Neurobiol.*, 45: 1-98.
- Marshall, J.S. & Waserman, S., 1995. Mast cells and nerves- potential interactions in the context of chronic disease. *Clin. Exp. Allergy*, 25: 103-110.
- Martin, F.C., Anton, P.A., Gornbein, J. A., Shanahan, F. And Merrill, J. E. 1993. Production of interleukin-1 by microglia in response to substance P: role for a non-classical NK-1 receptor. *J. Neuroimmunol.* 42: 53-60.

- Martin, F.C., Charles, A., Sanderson, M.J. And Merrill, J. E. 1992. Substance P stimulates Interleukin-1 production by astrocytes via intracellular calcium. *Brain Res.* 599: 13-18.
- McIntosh, J.M., Ghomashchi, M.H. Gelb, M.H., Dooley, D.J., Stoehr, S.J., Giordani, A.B., Naisbitt, S.R., Oliveira, B.M., 1995. *J.Biol. Chem.* 270: 3518-3526.
- Meneses, O., 1974. Los animales venenosos Y sus peligros. Instituto de Salud Pública, Lima Peru. Publicacion nº 2:3-14.
- Moreno, J.J., 1993. Time-course of phospholipase A₂, eicosanóid release and cellular accumulation in rat immunological air pouch inflammation. *Int. J. Immunopharmac.* 15, 597-603.
- Moreno, J.J., Ferre, X., Ortega, E., Carganico, G., 1992. Phospholipase A₂-induced oedema in rat skin and histamine release mast cells. Evidence for involvment of Lisophofpholipids in the mechanism of action. *Agents Actions* 36, 258-263.
- Murakami, M., Hara,N., Kudo,I., Inoue, K., 1993. Triggering of desgranulation in mast cells by exogenous type II phospholipase A₂. *J. Immunopharmac* 151: 5675-5684.
- Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G., Inoue, K., Kudo,I., 1997. *Crit. Rev. Immunol.* 17: 225-283.
- Nicolas, J.P., Lin, Y., Lambeau, G., Ghomashchi, F., Lasdunski, M., Gelb, M.H., 1997. *J. Biol. Chem* 272: 7173-7180.
- Noback, C.R., Strominger, N.L., Demarest, R.J.,1999. Neuroanatomia: Estrutura e Função do sistema Nervoso Humano. Ed. Premier, 5ª ed.
- Ogawa, K., Nabe,T., Yamamura, H., Kohno, S., 1999. Nanomolar concentrations of neuropeptides induce histamine release from peritoneal mast cells of a substrain of wistar rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 374: 285-91.
- Ohno, M., Menez, R., Ogawa, T., Danse, J.M., Shimohigashi, Y., Fromen, C., Ducancel, F., Zinn-Justin,S., Le Du, M.H., Boulain, J.C., Tamiaya,T., Menez, 1998. *A. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*5:307-364.

- Osaka, A., 1989. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake enoms. In: handbook of experimental Pharmacology (Ed. Lee CY), pp. 480-546. Springer, New York.
- Ovadia, M., Kochva, E., 1977. Neutralization of viperidae and Elapidae snake venom by sera of different animals, *J. Biochem.* 15: 541-545.
- Palframan, R., Wilsoncroft, P., Costa, S.K.P., Antunes, E., de Nucci, G., Brain, S.D., 1996. the effect of a tachykinin NK1 receptor antagonist SR14033 on oedema formation induced in rat skin by venom from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Br.J.Pharmacol.* 118: 295-298.
- Perales, J. Villela, C., Domont, D.B., Choumet, V., Saliou, B., Moussatché, H., Bon, C., Faure, G., 1995. Molecular Structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. *Eur. J. Biochem.* 227. 19-26.
- Pérez, O.C.Costa, 1998. Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas en almohadilla plantar del ratón inducidas por venenos de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. *Toxicon* 36, (8):1165-72.
- Ponce-Soto, L. A., Toyama M.H., Hyslop S, Novello JC, Marangoni S., 2002. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel phospholipase A₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *J. Protein. Chem* 21 (3); 131-136.
- Pruzanski, W. , Keystone, E.C., Sternby, B., Bombardier, C., Snow, K.M., Vadas, P., 1998. Serum phospholipase A₂ correlates with disease activity in rheumatoid arthritis. *J. Reumat.* 15, 1351-1356.
- Pruzanski, W. and Vadas , P., 1991. Phospholipase A₂ - a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immun. Today* 12, 143-146.
- Quartara, L., Maggi, C.A., 1998. The tachykinin NK1 receptor. Part II: distribution and pathophysiological roles. *Neuropeptides*, 32: 1-49.
- Regoli D., Drapeu G., Dion S., D'Orléans-Just PD, 1989. Receptors for substance P and related neurokinins. *Pharmacology* 38: 1-15.

- Rizzo, M.T., Nguyen, E., Aldo-Benson, M., Lambeau, G., 2000. *Secreted phospholipase A₂ induces vascular endothelial cell migration*. *Blood* 96 (12):3809-15.
- Rosenfeld, G. 1971. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In *venomous Animals and Their Venoms*. W. Bucherl, and E. E. Buckley, editors. *Academic Press*, New York. 345-403.
- Rübsamen, K., Breithaupt, H., Habermann, E., 1971. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 270: 274-288.
- Russel, F., 1983. Snake venom poisoning sholium International. Inc New York. 561.
- Santoro, M. L., Sousa E Silva, M. C., Gonçalves, L. R., Almeida-Santos, S. M., Cardoso, D. F., Laporta-Ferreira, I. L., Saiki, M., Peres, C. A., Sano-Martins, I. S., 1999. Comparison of the biological activities in venoms from three subespécies of the South American Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 122(1): 61-73.
- Sawai, Y. 1980. Studies on snakebites in the asian areas. IN *natural Toxins*. D. Eaker and T. Wadstrom, eds., *Pergamon Press*, Oxford. 25-32.
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166(2):368-379.
- Schwartz, L.B., 1994. Mast cells: Function and contents. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 91-97.
- Seilhamer, J.J., Pruzanski, W., Vadas, P., Plant, S., Miller, J.A. Kloss, J., et al. Johnson L.K., heinzmann C., Klisakl., Sparkes R.S., 1989. cloning and recombinant expression of phospholipase A₂ present in rheumatoid arthritic suynovial *J Cell Biochem* 264: 5353-8.
- Siqueira Jr, J. F., Dantas, C.J.S., 2000. Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação. Médica Científica Ltda, Rio de Janeiro, RJ.
- Six, D.A., Dennis, E.A., 2000. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: Classification and characterization. *Biochem. Biophys. Acta* 1488: 1-19.

- Slotta, K.F. & Fraenkel-Conrat, H.L., 1938. Schlangengifte III. Mitteilung: Reinigung und Kristallisation des Klapperschlangengiftes. *Bericht Deutsche Chemische Gesellschaft*, 71: 1076-1081.
- Snider, R.M., Constantine, J.W., Lowe, J.A., Longo, K.P., Lebel W.S., woody, H.A., Drozda, S.E., Desai, M.C., Vinik, F.J., Spencer, R.W., Hess, H.J., 1991. A potent nonpeptide antagonist of substance P (NK1) receptor. *Science* 251 : 435-7.
- Soerensen, B., 2000. Acidentes por animais peçonhentos. Reconhecimento, clínica e tratamento. Ed. Atheneu. São Paulo. p. 1-45.
- Stocker, K.F., 1990. Medical use of snake Venom Proteins. CRS Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, 66-78.
- Stricker, S., 1876. untersuchungen über die gefabwurzeln des ischiadicus. *Sitzungsber Kaiserl Akad (Wiss)* 3: 173-185.
- Strong, P.N., in: Dowdall, M.J., Hawthorne, J.N. (Eds.), 1987. Cellular and molecular basis of cholinergic function, *Ellis Horwood, Chichester, Sussex*: 543-549.
- Sufka, K.J., Cshomburg, F.M. & Giordano, J., 1991. Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 41 : 53-56.
- Szolcsányi, J., 1977. A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerves fibres and receptor endings in mediating pain. *J. Physiol.* 73: 251-259.
- Tan, N. H., Saifuddin, M. N. And Yong, W. Y., 1991. The edema inducing activity of phospholipase A2 enzymes. *Biochem. Int.* 23 , 175-181.
- Towler, P.K. & Brain, S.D.. Activity of tachykinin NK1 and bradykinin B₂ receptor antagonists, and opioid ligand at different stimulation parameters in neurogenic inflammation in the rat. *Neurosci. Lett.*, 257: 5-8.
- Toyama M. H., Mancuso L. C., Giglio J.R., Novello J.C., Oliveira B. and Marangoni S., 1995. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins I and II: Two myotoxins from Bothrops pirajai snake venom: N-terminal. *Biochemistry and Molecular Biology International* 37 (6): 1047 - 1055.

- U. Satahl, M. Lee, S. Sjodahl, D. Archer, F. cellini, B. Ek, R. Iannacone, D. Mackenzie, L.Semeraro, E. tramontano, S. Stymme, (1999). *Plant Mol. Biol.* 41: 491-490.
- Vadas, P., 1984. Elevated plasma phospholipase A₂ levels correlation with hemodynamic and pulmonary changes in Gram-negative septic shock. *J. Lab. Clin., Med.* 104, 873-877.
- Valente, R.H., Novello, J.C., Marangoni, S., Oliveira, B., Pereira-Da-Silva, L., Macedo, D.V. Mitochondrial swelling and oxygen consumption during respiratory state 4 induced by phospholipase A(2) isoforms isolated from the South American Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *Toxicom* 36 (6); 901-913.
- Valentin, E., Ghomashchi F., Gelb, M.H., Lazdunski, M., Lambeau, G., 1999. On the diversity of secreted phospholipases. *J. Biol. Chem.* 274: 31195-202.
- Valentin, E., Koduri, R.S., Scimeca, J.C., Carle, G., Gelb, M.H., Lazdunski, M., Lambeau, G., 1999. *J. Biol. Chem.* 274: 19152-19160.
- Valentin, E., Lambeau, G., 2000. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. *Bioch. Biophys. Acta*: 59-70.
- 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.
- Von Euler, U.S., Gaddum, J.H., 1931. An unidentified depressor substance in certain tissues extracts. *J. Physiol.*, 72: 577-583.
- Ward, R.J., Alves, A.R., Ruggiero Neto, J., Arni, R.K., Casari, G., 1998. *Protein Eng.* 11 : 285-294.
- Xu. X.J., Dalsgaard, C.J., Maggi, C.A., Wiesenfeld-Hallin, Z, 1992. NK-1, but not NK-2, tachykinin receptors mediate plasma extravasation induced by antidromic C-fiber stimulation in rat hindpaw: demonstrated with the NK-1 antagonist CP-96, 345 and the NK-2 antagonist Men 10207. *Neurosci. Lett.* 139 : 249-52.
- Young, P.A. & Young, P.H., 1998. *Bases da neuroanatomia clínica*. ED. Guanabara.

APÊNDICES

Produção científica

- PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

- 1- Neurogenic inflammation induced by PLA₂ from *Crotalus durissus coliligneatus* and *Crotalus durissus terrificus* venom on rat dorsal skin. (SBFTE- 2002);
- 2-Characterization of oedematogenic activity of crotoxin isolated from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake venom on the rat dorsal skin. (FESBE- 2001);
- 3-Characterization of insulin releasing activity of crotapotin, an acid subunit of crotoxin, on rat pancreatic β -cell. (FESBE-2001)

- ARTIGOS

- 1- Capsaicin sensitive primary afferent neurones and mast cells participation in the plasma protein extravasation induced by crotapotins and PLA₂s isolated from *Crotalus durissus* sp. ²Câmara, P.R.S., ²Esquisatto, L.C.M., ²Camargo, E.A., ²Antunes, E., ¹Toyama, M.H., ¹Marangoni, S., (submetido)
- 2-Structural and biological characterization of novel PLA₂ isoform isolated from the *Crotalus durissus collilineatus* venom. Marcos H.Toyama, daniela G. Oliveira, Renata G. Rosa, Everardo M. Carneiro, Paula R.S.Câmara, Edson Antunes, Gilberto de Nucci, Luis OS. Berian, Paulo Juazeiro, sergio Maramgoni and Antonio C. Boschero (submetido)
- 3-Structural and Biological characterization of a novel crotapotin like isoform isolated from the *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (Maramcabóia). Oliveira , D. G., Toyama, M. H., Martins, A. M.C., Marangoni, S., Câmara, P.R.S., Antunes, E., De Nucci, G., Beliam, L.O.S., Fonteles, M.C., Monteiro, H. S.A (submetido)



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

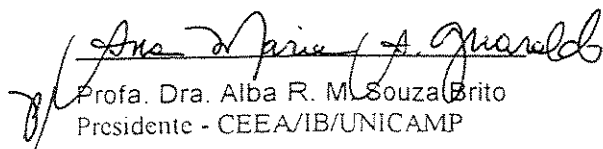
Certificamos que o Protocolo nº 377-1, sobre "Participação de neurônios sensoriais no aumento de permeabilidade microvesicular induzido por crotapotinas e fosfolipases A₂ (PLA₂) isolados de crotalus" sob a responsabilidade de

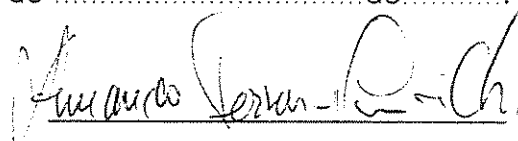
..... está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 03/05/2002.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 377-1, entitled "Participation of sensitive neurons in the increase of the microvesicular permeability in mice induced by crotapotins and phospholipase A₂ (PLA₂) isolated of Crotalus" 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 03/05/2002
(d) (m) (y)

Campinas, 03 de Maio de 2002


Prof. Dra. Alba R. M. Souza Brito
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP


Prof. Dr. Armando Ferreira Lima
Secretário - CEEA/IB/UNICAMP