UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Andrana Karla Calgarotto

"Caracterização Físico-Química e Biológica de uma Fosfolipase A₂ Isolada do Veneno de *Bothrops moojeni*"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) dropper Karla Calgarotto <u>Ar</u> .. 12 e aprovada pela Comissão dalgadora.

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

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Sérgio Marangoni

Campinas, 2008

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

C128c	Calgarotto, Andrana Karla Caracterização físico-química e biológica de uma fosfolipase A ₂ isolada do veneno de <i>Bothrops moojeni I</i> Andrana Karla Calgarotto. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.
	Orientador: Sérgio Marangoni. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Veneno - Purificação. Fosfolipase A₂. Marangoni, Sérgio. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Physicoquemical and biologic characterization of phospholipase A_2 isolated from *Bothrops moojeni* venom.

Palavras-chave em inglês: Venom - Purification; Characterization; Phospholipase A2. Área de concentração: Bioquímica. Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Sérgio Marangoni, Saulo Luis da Silva, Carolina Borja de Oliveira. Data da defesa: 14/03/2008. Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 14 de março de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Assinatura

Profa. Dra. Caroline Ribeiro de Borja Oliveira

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

der not uno

Prof. Dr. Gláucia Coelho de Mello

Prof. Dr. Luis Alberto Ponce-Soto

Assinatura

Assinatura

Dedicatória

Ao Victor, aos meus pais queridos Ires e Maria de Lourdes e a minha irmãzinha Andressa, pela compreensão, amor e amizade, dedico-lhes do fundo do meu coração esse trabalho. Amo muito vocês!

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Marangoni pela confiança, incentivo e orientação durante a realização deste trabalho. Agradeço muito por ter me aceito como sua aluna.

Ao meu amigo e sempre orientador Saulo Luis da Silva por sua ajuda incomparável pois só através dela estou aqui concluindo este trabalho. Muito obrigada!

Meus sinceros agradecimentos a minha amiga Daniela Carla da Silva Damico pela grande ajuda e pelo grande acolhimento nos momentos os quais me senti mais perdida. Muito Obrigada!

Ao Luis Ponce-Soto pela ajuda desde do inicio do meu mestrado

Ao Paulo Baldasso, o nosso querido Paulinho pela amizade e apoio técnico no laboratório.

Aos Profs. Drs. Caroline Ribeiro de Borja Oliveira e Hiroshi Aoyama por terem aceito o convite para participar da minha banca examinadora.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Química de Proteínas: Ana Paula, Vera Lúcia, Eduardo, Fabiana, Simone e a todos os peruanos.

Aos animais que doaram a vida à pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Mestrado.

Por último, gostaria de agradecer à Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), em especial ao Instituto de Biologia (IB) por essa tão grande oportunidade.

Índice

Lista de abreviações	viii
Resumo	ix
Abstract	xi
1. Introdução	1
1.1 Ofidismo	1
1.2 Aspectos gerais dos venenos	3
1.3 O veneno botrópico	3
1.4 Fosfolipase A ₂	5
1.4.1 Atividade enzimática e efeitos farmacológicos	9
1.4.2 Miotoxinas	10
1.4.3 Neurotoxinas	11
1.4.4 Efeitos Inflamatórios	12
2. Objetivos	14
2.1 Purificação de uma isoforma de PLA ₂ a partir do veneno total de <i>Bothrops moojeni</i> ,	
empregando cromatografia de alta eficiência em sistema de HPLC de fase reversa	14
2.2 Caracterização físico-química da isoforma BmTX-I proveniente da purificação do ven	eno
total de <i>Bothrops moojeni</i>	14
2.3 Caracterização biológica da isoforma BmTX-I proveniente da purificação do veneno t	otal
de Bothrops moojeni	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1 Animais	15
3.2 Venenos e reagentes	15
3.3 Purificação em HPLC de fase reversa	15
3.4 Eletroforese em PAGE-SDS	15
3.5 Determinação da atividade PLA ₂	16
3.6 Cinética enzimática	16
3.6.1 Efeito da temperatura	16
3.6.2 Efeito do pH	17
3.6.3 Efeito de íons divalentes.	17
3.6.4 Efeito inibitório por crotapotinas crotálicas.	17
3.7 Análise de espectormetria de massas por Maldi-Tof (MS)	17
3.8 Análise de aminoácidos	
3.9 Determinação da região N-terminal	18
3.10 Atividades farmacológicas	18
3.10.1 Atividade neurotóxica em músculo biventer cervicis de pintainho.	
3.10.2 Atividade miotóxica através de determinação dos níveis de CK plasmáticos	19
3.10.3 Atividade inflamatória através de edema de pata	19
3.10.4 Atividade inflamatória através da quantificação de interleucina 6 (IL-6)	
3.11 Análise Estatística	19
4. Resultados	
4 1 Perfil cromatográfico da PLA ₂ BmTX-L isolada a partir do veneno total de <i>Bothrons</i>	•
<i>mooieni</i> através de sistema de HPLC utilizando coluna de fase reversa	20
4.2 Confirmação do grau de pureza da PLA ₂ BmTX-I através de sistema de cromatografia	em
HPLC utilizando uma coluna de fase reversa	
4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presenca de dodecil sulfato de sódio-SDS-	
PAGE	22

4.4 Estudos cinéticos da PLA ₂ do veneno total e da BmTX-I	23
4.4.1 Medida da atividade PLA ₂ do veneno total e da BmTX-I	23
4.4.2 Efeito da concentração do substrato na atividade PLA ₂ da BmTX-I	24
4.4.3 Efeito do pH na atividade da isoforma PLA ₂ da BmTX-I	25
4.4.4 Efeito da temperatura na atividade da PLA ₂ da BmTX-I	25
4.4.5 Efeito de íons divalentes na atividade PLA ₂ da BmTX-I	26
4.4.6 Medida da atividade inibitória das isoformas de crotapotina (F3 e F4) de Crotalus	
durissus collilineatus sobre a atividade PLA2 da BmTX-I	27
4.5 Análise da composição de aminoácidos da PLA ₂	28
4.6 Determinação da massa molecular por espectrometria de massas (Maldi-Tof da PLA ₂	
BmTX-I	29
4.7 Estudo da região N-terminal e estudo de homologia seqüencial da PLA ₂ BmTX-I	30
4.8 Estudo da atividade neurotóxica in vitro na preparação biventer cervicis de pintainho d	do
veneno total de Bothrops moojeni	31
4.9 Contraturas induzidas por Acetilcolina (ACh) e Potássio (KCl) em preparação bivente	r
cervicis de pintainho (BCp) antes e após a adição do veneno	35
4.10 Determinação dos níveis de CK plasmáticos in vivo intramuscular	36
4.11 Estudo da atividade inflamatória através da quantificação de interleucina 6 (IL-6)	37
4.12 Estudo da atividade inflamatória através de edema de pata	38
5. Discussão	39
6. Conclusões gerais	47
7. Referências bibliográficas	48

Lista de Abreviações

RP HPLC	Reverse Phase HPLC							
C18	18 High Carbon Load, High activity silica							
μ- Bondapak C18	Coluna de HPLC com n-octadecyl como base da fase estacionária							
PAGE	Eletroforese em Gel de poliacrilamida							
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio, Lauril Sulfato de Sódio							
Tris	Tris [Hidroximetil] aminometano							
I.M.	Intramuscular							
ACh	Acetilcolina							
F3 e F4	Crotapotinas provenientes do veneno de Crotalus durissus collilineatus							
СК	Creatina Quinase							
IL-6	Interleucina 6							
PLA ₂	Fosfolipase A ₂							
TFA	Ácido Trifluoracético							
S.C.	Sub-cutânea							
DTT	1,4 dithioerythritol							

Resumo

Bothrops moojeni é uma espécie de serpente de grande importância devido a sua ampla distribuição na América do Sul e Central além dos quadros clínicos que o veneno causa. Dentre as espécies peçonhentas brasileiras o gênero *Bothrops* é o mais numeroso e é o que apresenta os maiores índices de notificações relacionados a acidentes ofídicos.

Os venenos de serpentes possuem uma mistura de substâncias biologicamente ativas sendo a maior parte composta por proteínas. Fosfolipases A_2 (PLA₂), proteínas presentes no veneno de serpentes, agem hidrolisando fosfolipídios de membrana na posição *sn*2 liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos, além de exibir uma ampla variedade de efeitos farmacológicos.

A isoforma de fosfolipase A_2 (PLA₂), denominada BmTX-I foi isolada através de um sistema de cromatografia em HPLC utilizando uma coluna de fase reversa µ-Bondapak C18. O alto grau de pureza foi confirmado através de eletroforese em SDS-PAGE Tricina (16,5%) e também através da determinação da massa molecular (14,238.71 Da) por espectrometria de massas (MALDI Tof).

A caracterização cinética da BmTX-I PLA₂ (Asp49) mostrou que tal isoforma é altamente estável e apresenta um pH ótimo de 8,0 e temperatura de 37° C. Frente a diferentes concentrações do substrato ácido 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzóico a BmTX-I mostrou um comportamento com tendência alostérica. Na ausência de Ca²⁺ e na presença de alguns íons divalentes tais como Mg²⁺, Mn^{2+} e Cd²⁺ (na concentração de 10mM) a atividade BmTX-I foi significativamente diminuída, já na presença de Ca²⁺ (1mM) e com os mesmos íons divalentes citados apresentou uma discreta atividade. Também foi demonstrado o efeito inibitório de crotapotinas crotálicas sobre a atividade PLA₂ da BmTX-I.

A análise de composição de aminoácidos mostra que se trata de uma proteína de caráter básico pela alta presença de Lys, His e Arg. A presença de 14 resíduos de cisteína sugere a formação de 7 pontes dissulfeto. O estudo de homologia seqüencial da região N-terminal entre BmTX-I com outras PLA₂ (Asp49) revelou um alto grau de homologia.

O efeito neurotóxico *in vitro* do veneno total e da BmTX-I foi analisado na preparação biventer cervicis de pintainho. Nossos resultados mostraram que a ação do veneno de *Bothrops moojeni* na junção neuromuscular é menos potente quando comparado com venenos crotálicos, já que estes últimos levam a um bloqueio muito mais rápido e usando-se baixas concentrações. No entanto, não se pode negar que houve uma ação neurotóxica *in vitro*. O completo bloqueio tanto do veneno total quanto da BmTX-I não foi acompanhado pela inibição das respostas ao potássio

(KCl) e a acetilcolina (ACh), exceto em altas concentrações de veneno (50 e 100 μ g/ml) o que demonstra uma ação pré-sináptica primordial.

Os testes *in vivo* do veneno total e da fração BmTX-I demonstraram o efeito miotóxico através da liberação de creatina quinase (CK) e o efeito inflamatório através de edema de pata e liberação de interleucina-6 (IL-6). O comportamento de liberação de CK foi semelhante tanto para o veneno total como para a PLA₂ BmTX-I, os quais tiveram o maior liberação de CK uma hora após a injeção i.m. Oito horas após a injeção os níveis de CK estavam similares aos do controle. Ocorreu liberação de IL-6 bem como ação edematizante tanto do veneno total como da BmTX-I.

A reprodutibilidade dos efeitos farmacológicos, só é possível com a utilização de frações quimicamente homogêneas que mantenham a integridade da função biológica. Essas frações são obtidas com metodologias de alta eficiência como HPLC, através do qual podemos isolar a BmTX-I em um único passo cromatográfico e o grau de pureza confirmado por espectrometria de massa. Estes resultados podem ser associados com a sua atividade biológica, eliminando a subjetividade causada por veneno total ou frações impuras.

Essa abordagem pode ser aplicada nos estudos bioquímicos, estrutura-função, fisiológicos e farmacológicos, podendo revelar mecanismos ainda desconhecidos na relação estrutura-função das PLA₂ procedentes de veneno de serpentes.

Abstract

Bothrops moojeni is a very important snake species due to its great distribution in the South and Central America besides the clinic alterations caused by the venom. Among the Brazilian species the *Bothrops* genus is the most numerous and shows the highest registrations related to ophidian accidents.

The snake venoms are source of biologically active substances which main components are proteins. Phospholipases A_2 (PLA₂), proteins present in the snake venom, hydrolyze the *sn*-2 acyl groups of phospholipids liberating fatty acids and lysophospholipds, besides exhibiting many pharmacological effects.

The fosfolipase A₂ (PLA₂) isoform, named BmTX-I was isolated through RP-HPLC performed on a C18 column. The high degree of purity was confirmed by SDS-PAGE and also by determining the molecular mass (14238.71 Da) in a MALDI TOF mass spectrometry.

The kinetic characterization of BmTX-I PLA₂ (Asp49) showed that the isoform was highly stable and presented an optimum pH of 8.0 and temperature of 37° C. At different substrate acid 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoic concentrations the BmTX-I showed allosteric behavior. In the absence of Ca^{2+} and in the presence of some divalent ions such as Mg^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{2+} (at the concentration of 10 mM) the BmTX-I activity significantly decreased. But in the presence of 1mM Ca^{+2} , under the same divalent ions conditions, the isoforms showed a discreet activity. An inhibitory effect of crotalic crotapotins on the activity PLA₂ was also demonstrated.

The analysis of amino acids composition showed a high content of basic amino acids such as Lys, His and Arg indicating a basic character for the BmTX-I. The presence of 14 cysteine residues suggests the formation of 7 disulfide bridges. N-terminal amino acid sequence revealed a high level of homology between BmTX-I and other Asp49 PLA₂s.

The neurotoxic effect of the whole venom and of BmTX-I was analyzed at chick biventer cervicis muscle preparation. Our results showed that the blockage of the muscle contraction was lesser when compared with crotalic venoms, which blockage at lower concentrations. Nevertheless it is sure that there was an *in vitro* neurotoxic action. The complete blockage, as much the whole venom as the BmTX-I, was not accompanied by any significant inhibition of the responses to KCl and to Ach, excepting at higher concentrations of the venom (50 e 100 μ g/ml) suggesting the primordial presynaptic action.

The tests *in vivo* with the whole venom and BmTX-I fraction showed the miotoxic effect through the creatine kinase (CK) releases and the inflammatory effect through edema-forming activity and interleukin-6 release.

The CK release was similar for both whole venom and BmTX-I, which showed higher liberation one hour after the i.m injection. After eight hours of injection the CK levels were similar to the controls. There was the IL-6 release as well as edema-forming activity both in to the whole venom and BmTX-I.

The reprodubility of pharmacological effects, is just possible with the utilization of chemically homogenous fractions that maintain the integrity of biological function. These fractions were obtained with high efficient methodologies as HPLC, through which this we the BmTX-I could be isolated in only one chromatography step, with purity direct by mass spectrometry. These results may be associated with the biological activities, eliminating the subjectivity caused by total venom or impure fractions.

This approximation may be applied to the biochemical, structure-function, physiological and pharmacological studies, and it may reveal still unknown mechanisms in the structure-function relationship of PLA_2 from the serpents venom.

1. Introdução

1.1 Ofidismo

As serpentes habitam praticamente todas as regiões do planeta com exceção apenas de locais onde as temperaturas são muito baixas, em algumas altitudes e nos círculos polares, e são divididas em quatro grandes famílias: Hydrophidae, Elapidae, Viperidae e Crotalidae (Matsui et al., 2000). O Brasil possui aproximadamente 250 espécies de serpentes, das quais cerca de 70 são venenosas e destas 32 pertencem ao gênero *Bothrops*, seis ao gênero *Crotalus*, dois ao gênero *Lachesis* e 29 ao gênero *Micrurus* (Barraviera, 1994).

Mundialmente os acidentes ofídicos são um problema maior na Ásia e nas regiões da América Latina como é o caso das ilhas do Caribe. O envenenamento ofídico é um evento comum em paises pobres e regiões tropicais e subtropicais, porém não possuem a devida atenção, e não são registrados adequadamente. No Brasil entre os anos de 1990 a 1993 foram notificados pela Fundação Nacional de Saúde –Ministério da Saúde (FUNASA- Ministério da Saúde) 81.611 casos de acidentes por serpentes, o que representa aproximadamente 20.000 casos / ano no país. Estatisticamente o veneno botrópico é o que apresenta os maiores índices de notificações em âmbito nacional, porém em letalidade representa apenas 0.31%, já o veneno crotálico pode, pelas análises epidemiológicas, ser considerado o mais importante.

Gênero	Nº. Casos	Nº. Óbitos	Letalidade (%)
Bothrops	119.238	396	0,31
Crotalus	10.143	189	1,87
Lachesis	1878	18	0,95
Micrurus	558	6	0,36
Não informado	26.678	138	0,52
Total	158.495	720	0,45

Tabela 1 Letalidade dos acidentes ofídicos, divididos por gênero (FUNASA-Ministério da Saúde, 2002).

Os envenenamentos por viperídeos são relevantes não tanto pela sua letalidade, mas sim pelos seus efeitos locais, tais como mionecrose, dermonecrose, hemorragia, edema, dor e em casos moderados e severos levam a alterações sistêmicas como coagulopatias, choque cardiovascular e insuficiência renal aguda.

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

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

 Afetam drasticamente o tecido muscular, os vasos sanguíneos e a pele, induzindo lesões que, com freqüência, deixam seqüelas.

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

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

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

O quadro 1 sintetiza o que foi exposto. Mas indiscutivelmente ainda há uma série de incógnitas com relação à patogênese destes efeitos, que ainda permanecem como um desafio para a pesquisa toxinológica na América Latina (Gutierrez e Lomonte 2003).



Quadro 1. Hipóteses sobre o desenvolvimento dos efeitos locais induzidos por venenos das serpentes da família Viperidae (Gutierrez, J.M. e Lomonte, B. 2003).

Atualmente uma maior atenção tem sido dada para o uso de venenos como ferramentas moleculares para o desenvolvimento de pesquisas ou agentes terapêuticos como é o caso do

Captopril (potente anti-hipertensivo), que foi sintetizado a partir do modelo molecular da toxina de *Bothrops jararaca* (Harvey et al., 1998).

1.2 Aspectos gerais dos venenos

Os venenos de serpentes são misturas complexas de substâncias bioquímicas e farmacologicamente ativas, sendo 90 a 95% do peso seco, compostos protéicos e o restante compreende carboidratos, cátions metálicos, nucleosídeos, aminas biogênicas (bradicinina, histamina, 4-hidroxitriptamina) e níveis menores de aminoácidos livres e lipídios (Kini, 2003).

Dentre os íons, podemos destacar o cálcio (Ca^{2+}) que é um importante co-fator da ação de algumas enzimas proteolíticas e das fosfolipases A₂. O magnésio e o zinco também são importantes íons para a ação das principais metaloproteases do veneno como as "trombina-like" (Kini, 2005).

Embora serpentes da mesma espécie possam diferir na composição do veneno, seus componentes parecem ter proporções comuns e similares dentro de uma mesma família, isto é, neurotoxinas são geralmente encontradas no veneno das Hydrophidae e Elapidae, enquanto que toxinas hemorrágicas e mionecróticas são encontradas no veneno das Crotalidae e Viperidae. (Kini, 2006).

As principais enzimas presentes nos venenos são classificadas nesses cinco grupos: oxidoredutases, glicosidases, hidrolases, proteases e lipases, sendo, as lipases e proteases os maiores alvos de estudos. No conjunto das proteases, tem sido isolado e caracterizado metaloproteases chamadas hemorraginas, abundantes em venenos de serpentes Crotalidae e Viperidae, que causam lesões do tipo hemorrágicas (Tu, 1997). Entre as lipases, as acetilcolinesterases e as fosfolipases são as enzimas mais comumente encontradas, sendo que as fosfolipases A₂ são as enzimas mais estudadas, não somente pelas suas propriedades químicas, mas também por sua importância biológica (Kini, 2003).

Além das enzimas hidrolíticas citadas, o veneno total também possui outras moléculas importantes sem atividade enzimática, como as desintegrinas e as lectinas. As desintegrinas possuem baixo peso molecular, e são ricas em resíduos de cisteínas. Elas contêm uma seqüência de aminoácidos Arg-Gly-Asp reconhecida pelas integrinas que inibem a interação do fibrinogênio com seus receptores. (Kamiguti et al, 1998). As lectinas possuem a capacidade de aglutinar células, precipitar polissacarídeos e glicoproteínas, pelo fato de se ligarem especifica e reversivelmente a determinados carboidratos.

3

1.3 O veneno botrópico

As serpentes do gênero *Bothrops* são encontradas em todo o território nacional, totalizando vinte espécies. Habitam ambientes úmidos (como matas e áreas cultivadas), locais de proliferação de roedores, zonas rurais e periferia de grandes cidades. Possuem hábitos noturnos e são consideradas de grande importância, do ponto de vista epidemiológico, pelo número de acidentes registrados.

São responsáveis por diversos fatores biológicos e farmacológicos, tais como: parada cardiovascular, coagulação sanguínea, hemorragias, liberação de histamina e bradicinina. (Markland, 2005). A ação coagulante do veneno botrópico possui a propriedade de transformar diretamente o fibrinogênio em fibrina, além de ativar a pró-trombina da cascata de coagulação sanguínea.

A ação direta de miotoxinas em tecidos é dependente de frações proteolíticas do veneno, podendo causar liponecrose, mionecrose e lise das paredes vasculares, caracterizando uma ação proteolítica ou necrosante. A ação vascular é causada por hemorraginas que agem sobre os vasos capilares, destruindo inicialmente a membrana basal e causando posteriormente a lise da membrana plasmática (Gutiérrez e Lomonte, 1997).

Bothrops moojeni

É conhecida popularmente como "caiçaca" e tem uma ampla distribuição na América do Sul e Central. A importância dos estudos desta espécie relaciona-se, além da sua distribuição geográfica, com os quadros clínicos característicos que esse veneno causa, como: reações proteolítica, coagulante e hemorrágica, causando dor, edema, necrose e intensa reação inflamatória.

A atividade miotóxica também está presente no veneno de *Bothrops moojeni*. As miotoxinas isoladas desse veneno pertencem ao Grupo II das fosfolipases A₂ e podem ser divididas em dois subgrupos: as PLA₂ D49 e as PLA₂ homólogas K49. Porém a miotoxina I (MjTX-I) e a miotoxina II (MjTX-II) que foram até então purificadas do veneno de *Bothrops moojeni* são proteínas com estrutura PLA₂, homólogas Lys49 (Soares et al., 2004). A MjTX-II está relacionada com a deficiência renal aguda como uma conseqüência de alterações morfológicas e estruturais nas células glomerulares e tubulares. Estudos realizados mostram uma relação entre deficiência renal e atividade citotóxica (Gutierrez e Lomonte, 1997). A MjTX-I apresenta atividades farmacológicas como: miotoxicidade local e atividade edematizante.

Também tem sido isolada uma L-aminoxidase com efeito bactericida, antitumoral, edematizante e de agregação plaquetaria proveniente do veneno de *Bothrops moojeni* (Stábeli, et al., 2007).

1.4 Fosfolipase A₂

Fosfolipases A₂ (PLA₂) hidrolisam fosfolipídios de membrana na posição *sn*2 liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos, tal como o ácido araquidônico. Ambos os produtos são precursores para moléculas sinalizadoras que podem exercer múltiplas funções biológicas. O ácido araquidônico pode ser convertido em eicosanóides através da ação de varias prostaglândinas sintetases, lipooxigenases e proteínas do citocromo P450. Os eicosanóides atuam em uma ampla variedade de processos fisiológicos e patológicos (Kini, 1997).

A família das fosfolipases A_2 ocorre amplamente na natureza e podem ser divididas em cinco principais grupos: PLA₂ secretoras, PLA₂ citosólicas, PLA₂ Ca²⁺ - independentes, PAF acetilhidrolases e PLA₂ lisossomais.

As fosfolipases A₂ secretoras são classificadas em três grupos de acordo com a sua estrutura primaria. O grupo I é composto por fosfolipases A₂ de pâncreas de mamíferos e de veneno de serpentes pertencentes às famílias Elapidae e Hydrofidae, entretanto o grupo II é formado por PLA₂s de venenos pertencentes às famílias Crotalidae e Viperidae. PLA₂s do grupo III tem sido isoladas principalmente de venenos de abelhas e lagartos (Dennis, 2000).

Estudos com mais de 50 PLA₂s de diferentes famílias revelaram características em comum entre esses três grupos: baixa massa molecular (14 kDa), uma α - hélice amino terminal anfipática, um "loop" para ligação de Ca²⁺, um sítio ativo e um grande número de pontes dissulfeto intramolecular (geralmente sete mas existem variações). Estas PLA₂s são geralmente termoestáveis e requerem íons Ca²⁺ para sua atividade.

Fosfolipases A₂ em mamíferos além da transmissão de sinais através da síntese de prostaglândinas e leucotrienos possui outras funções celulares como homeostasia da membrana incluindo a manutenção de fosfolipídios de membrana e reparo de membrana através de deacilação e reacilação (Dennis, 1994; Winstead, 2000). Também possuem papeis importantes na fertilização, proliferação celular, contração celular, hipersensibilização e doenças inflamatórias crônicas (Kini, 2003).

Entretanto, fosfolipases A_2 de mamíferos são geralmente não tóxicas e falham para induzir efeitos farmacológicos potentes. Porém as fosfolipases A_2 de serpentes por possuírem papel na digestão de suas presas exibem uma ampla variedade de efeitos farmacológicos interferindo em processos fisiológicos normais (Kini, 1997a). Alguns dos componentes mais tóxicos e farmacologicamente ativos presentes nos venenos de serpentes são fosfolipases A_2 . Por exemplo, todas as neurotoxinas pré-sinápticas conhecidas de venenos de serpentes são fosfolipases A_2 ou contém fosfolipase A_2 como parte integral. A habilidade para induzir efeitos farmacológicos com alta potência evidencia a importância da fosfolipase A_2 na toxicidade dos venenos de serpentes.

Embora uma variedade de efeitos farmacológicos sejam induzidos por fosfolipases $A_{2,}$ nem todos os efeitos são induzidos por todas as fosfolipases $A_{2,}$ Cada enzima exibe um efeito farmacológico especifico; as β - bungarotoxinas contém fosfolipase A_2 que induz efeitos présinápticos, mas não apresenta atividade pós-sináptica, miotóxica nem anticoagulante (Gutierrez e Lomonte, 1997).

Apesar das diferenças em suas propriedades farmacológicas, as PLA_{2s} possuem de 40-90% de identidade em suas seqüências de aminoácidos e significante similaridade na sua estrutura tridimensional (Scott, 1997). Então as diferenças estruturais entre as PLA₂s não podem ser facilmente relacionadas com suas diferenças biológicas, o que torna intrigante os mecanismos pelos quais as PLA₂s de veneno de serpente induzem a uma ampla variedade de efeitos farmacológicos.

Para explicar a suscetibilidade de um tecido por uma fosfolipase A_2 em particular na superfície de células e tecidos alvos foi proposto a presença de um sitio alvo especifico na superfície de células ou tecidos alvos. Esses sítios alvos são reconhecidos por sítios farmacológicos específicos na fosfolipase A_2 (Figura 1). O sítio alvo e o sítio farmacológico são complementares entre si através de complementaridade de cargas, hidrofobicidade e interações de van der Walls (Kini, 2003). A alta afinidade entre os sítios alvo e farmacológico determina a especificidade dos efeitos farmacológicos da fosfolipase A_2 .

Assim, o esquema 1 representa a hipótese apresentada por Kini, (2003):

1 – A célula alvo difere de uma célula não alvo (extremo direito), pela presença de um sítio alvo (A). As células ou tecidos diferentes possuem os sítios alvos distintos na superfície.
 Estes sítios alvos podem ser uma proteína ou glicoproteína transmembrana que se encontra na superfície da célula.

2 – Temos o sítio complementar ao sítio alvo, o sítio farmacológico (F) que está presente na PLA₂ específica, além do sítio catalítico (C). Uma PLA₂ não específica (extremo direito) não possui o sítio farmacológico (F). A natureza dos sítios farmacológicos na superfície molecular das PLA₂ variam com a enzima. 3 – Quando se administra a PLA₂, através da via intraperitoneal ou intravenoso, as PLA₂ específicas procuram e se ligam às células alvos, devido à sua afinidade alta pelo sítio alvo. Esta ligação específica, assim como a acessibilidade do sítio alvo, dependeria da acessibilidade da célula. Por outro lado, uma PLA₂ não específica vai se ligar a muitos tipos diferentes de células. As PLA₂ não específicas, assim, não vão lesar a célula alvo eficazmente como a PLA₂ específica.

4 – Em um sistema *in vitro* ou *ex vivo*, uma célula, tecido ou órgão é incubada com a PLA₂. As PLA₂ específicas e não específicas podem lesar a célula alvo e poderiam exibir "Efeitos farmacológicos". Isto é particularmente verdade quando a atividade enzimática desempenha um papel maior, induzindo o efeito farmacológico, embora sejam necessárias quantidades mais altas (ou cataliticamente as quantidades muito eficazes) de enzimas não específicas para induzirem os efeitos similares das PLA₂ específica.

 $5 - As PLA_2$ específicas se ligam ao alvo (ou aceptor), a proteína na membrana plasmática (MP) com uma alta afinidade (10⁻⁹ M). No entanto, também ocorre uma afinidade baixa (10⁻⁴ a 10⁻⁶ M) quando se liga a fosfolipídios. Os estudos de ligação específica sempre indicam a afinidade alta e baixa aos sítios alvos. A afinidade é alta ao sitio alvo, é baixa comparada a sítios de ligação de baixa afinidade. Os tratamentos para destruir as proteínas alvo produzem a perda da alta afinidade de se ligar, mas não baixa a afinidade dos sítios alvos. Assim, as PLA₂ não específicas ligam-se aos fosfolipídios com a afinidade baixa e não se liga ao sítio alvo.

6 – Vemos que o sítio alvo é um "bom encaixe" para o sítio farmacológico em espécies de células ou tecidos susceptíveis. As espécies não susceptíveis, são aquelas que têm sofrido processos de mutações (M) ou modificações pós traducionais (MPT) como por exemplo glicosilações. Células ou tecidos susceptíveis são suficientes para alterar a afinidade específica da PLA₂ com a célula alvo. Isso explica a especificidade das espécies observadas, na habilidade das PLA₂ de exibir seus efeitos farmacológicos (Kini, 2003).

1. Sítios alvo na superficie celular A 2. Sítio farmacológico das PLA_2 F 3. Adminsitração in vivo das PLA2 PLA₂ específica PLA₂ não específica 4. Estudos de PLA2 in vitro ou ex vivo PLA₂ específica PLA₂ não específica 4. Ligação de afinidade de PLA₂ PLA₂ específica PLA₂ não específica baixa baixa baixa baixa baixa alta 664 MP A A 5. Especies específicas M M MPT ∐ Suceptível \cap _____ Não suceptível Não suceptível

Esquema 1 - Modelo para explicar os efeitos farmacológicos das PLA2 (Kini, 2003).

1.4.1 Atividade Enzimática e efeitos farmacológicos

PLA₂s são as únicas enzimas hidrolíticas que possuem alta solubilidade em água, mas hidrolisam substratos insolúveis em água, como os fosfolipídios. Elas hidrolisam fosfolipídios na forma monomérica, micelar e na forma de bicamada porém exibem um grande aumento na sua atividade catalítica quando fosfolipídios monoméricos se agregam formando micelas em sua concentração micelar critica.

As enzimas PLA₂s provenientes de veneno podem induzir sintomas farmacológicos, os quais podem ser dependentes ou independentes da atividade catalítica dessa enzima. No caso das atividades farmacológicas dependentes da atividade catalítica, muito dos sintomas podem ser causados pela hidrólise total dos fosfolipídios ou pela liberação de lisofosfolipídios e ácidos graxos.

A hidrólise total de fosfolipídios de membrana tem registrado alguns efeitos, tais como: 1) Mudanças na conformação biológica das membranas (Lomonte, et al., 2003); 2) Alterações no comportamento da molécula alvo, devido a mudanças em seu micro ambiente; 3) Mudanças na permeabilidade seletiva a íons, drogas; 4) Alterações na função do sistema receptor-ligante, o qual depende muito de fosfolipídios acoplados ao sistema (Rosemberg, 1986).

Os mecanismos de indução dos efeitos farmacológicos, os quais são dependentes da ação enzimática, são detalhados no esquema 2. Ao contrário, os efeitos farmacológicos podem ser induzidos pela união física da enzima PLA₂ à molécula alvo, sendo independentes da atividade catalítica. A união física pode interferir de alguma forma (esquema 2), impedindo a união de metabólitos aos segundos mensageiros. As PLA₂ podem também evidenciar estes efeitos pela ação de agonistas. A união das PLA₂ a receptores específicos pode ser fundamental e contribuir com a alteração do status metabólico das células alvo. Nesta alteração do status metabólico das células alvo, pode haver liberação de mensageiros primários, que proporcionam os efeitos farmacológicos observados.

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

9



Esquema 2: Modos e mecanismos de ação de enzimas fosfolipases A₂, sendo: A) Mecanismos dependentes da atividade catalítica; e B) Mecanismos independentes da atividade catalítica (Kini R.M. e Evans, H.J. 1989).

As fosfolipases A_2 de veneno de serpentes exibem uma ampla variedade de efeitos farmacológicos entre eles neurotoxicidade tanto pré quanto pós-sináptica, miotoxicidade, cardiotoxicidade, efeitos anticoagulantes, atividade hemolítica, atividade edematizante entre outras (Kini 2003, Gutiérrez e Lomonte, 2003).

1.4.2 Miotoxinas

As miotoxinas podem ser definidas como componentes naturais (usualmente pequenas proteínas ou peptídeos) do veneno de serpentes que induzem prejuízos irreversíveis a fibra

muscular após injeção em animais. Elas são particularmente abundantes e amplamente distribuídas nos venenos de serpentes, porém podem ser encontradas nos venenos de outros organismos. Algumas toxinas agem localmente prejudicando a fibra muscular no local da injeção, entretanto outras agem sistematicamente, causando prejuízos musculares em sítios distantes. Mionecrose é uma importante complicação médica da picada de serpente. Em vários casos a mionecrose local pode provocar seqüelas drásticas como perda tecidual permanente, incapacidade ou amputação (Gutierrez e Onwby, 2003). Por outro lado, miotoxicidade sistêmica pode provocar mioglobonuria e insuficiência renal severa, uma causa freqüente de morte por picada de serpente (Azevedo-Marques et al., 1982).

A rápida ruptura das células musculares é seguida por uma série de eventos degenerativos os quais são similares para várias PLA₂ miotóxicas, independentemente de sua fonte e da presença ou ausência de atividade enzimática. Ocorre um rápido efluxo de moléculas citosólicas tais como creatina quinase (CK), lactato desidrogenase, aspartato amino transferase, mioglobina e creatina.

As miotoxinas de veneno de serpente podem ser classificadas em três grupos: pequenas miotoxinas, cardiotoxinas e PLA₂s miotóxicas. As PLA₂s miotóxicas formam um grupo que pode ser categorizado em neurotóxicas e não-neurotóxicas.

As miotoxinas neurotóxicas são comumente encontradas em venenos Elapídicos, os quais possuem um papel importante no efeito letal. Sua dose letal de 50% (DL₅₀) possui valores extremamente baixos, devido a potentes efeitos pré-sinápticos na junção neuromuscular. Além disso causam impressiva necrose muscular em baixas doses (1 a 2 μ g).

Já as miotoxinas não neurotóxicas são mais comumente encontradas em venenos Viperídeos. Em contraste com as neurotóxicas possuem valores de DL_{50} altos por isso seu efeito letal é de pouca relevância. Sua potência miotóxica é também menor quando comparada com PLA_{2} s do tipo neurotóxicas (25-100 µg) (Soares et al., 2000).

Entre as miotoxinas não neurotóxicas ocorre a presença de dois tipos: PLA₂ Asp49 a qual catalisa ligações éster na posição *sn*2 de glicerofosfolipídios e as PLA₂ K49 ou "PLA₂-like" as quais são desprovidas de atividade enzimática, segundo Lomonte et al., (2003).

1.4.3 Neurotoxinas

As neurotoxinas de venenos de serpentes afetam a junção neuromuscular, causando dessa forma uma paralisia flácida. As neurotoxinas por não ultrapassarem a barreira hematoencefálica

agem preferencialmente no sistema nervoso periférico. Apenas com alterações graves podem alcançar o sistema nervoso central (Monterrey, 2001).

Os venenos de serpentes possuem toxinas capazes de inibir a transmissão neuromuscular pré-sináptica e a transmissão pós-sináptica. A neurotoxicidade pré-sináptica está, na maioria das vezes, associada à fosfolipase A₂ (Hodgoson e Wickramaratna, 2002).

A atividade das neurotoxinas possui pronunciada importância, pois tem sido encontrada em várias famílias de serpentes peçonhentas: Crotalidae, Elapidae, Hydrofidae e Viperidae. Muitas delas possuem atividade fosfolipase A₂, porém a atividade neurotóxica não tem relação direta com atividade enzimática. Acredita-se que a função das neurotoxinas além de digerir a presa é também de imobilizar e matar a presa. Nos seres humanos, a paralisia associada a essas toxinas pode durar até três semanas (Hodgson e Wickramaratna, 2002).

As neurotoxinas com atividade pós-sináptica são denominadas α -neurotoxinas, possuem baixo peso molecular (7 a 8 kDa) e não possuem atividade enzimática (Karlsson et al., 1979). São neurotoxinas antagonistas dos receptores nicotínicos no músculo esquelético ligando- se com alta afinidade aos receptores nicotínicos de acetilcolina no músculo esquelético (Hodgson e Wickramaratna, 2002).

1.4.4 Efeitos Inflamatórios

Inflamação é uma reação de injuria tecidual. É uma resposta protetora na qual um conjunto de estágios ocorre para a reconstituição da função normal do tecido injuriado (Teixeira, et al., 2003).

A resposta imediata para uma agente, inflamação aguda, inclui alteração no calibre vascular e no fluxo sanguíneo, mudanças estruturais na microvasculatura que favorece o extravasamento de proteínas plasmáticas e leucócitos, migração de leucócitos da microcirculação e sua acumulação no local da inflamação, seguida de fagocitose por células competentes (Teixeira, et al., 2003).

A reação inflamatória é mediada por substâncias ativas mobilizadas endogenamente, denominadas "mediadores químicos" da inflamação. Mediadores químicos são originados ou a partir do plasma ou a partir de células como eicosanóides, citocinas, histamina e serotonina.

Eicosanóides podem mediar cada fase da reação inflamatória. O ácido araquidônico é o maior precursor de eicosanóides. Três formas de PLA₂ estão envolvidas na liberação de araquidonato das membranas celulares: tipo IV, PLA₂ citoplasmática e PLA₂ do tipo II e V as quais hidrolisam ligação éster sn-2 de fosfolipídios (Smith et al, 2000). Em seguida enzimas

12

ciclooxigenases convertem o araquidonato em prostaglândinas e tromboxanos. Outros mediadores derivados de fosfolipídios como leucotrienos e fator de ativação plaquetaria também exercem fatores relevantes como mediadores de inflamação.

Entre outras substâncias pode-se citar aminas vasoativas, histamina e serotonina, que estão entre os primeiros mediadores que são liberados durante o processo inflamatório e as citocinas como IL-I e TNF ($\alpha \in \beta$). Já citocinas do tipo IL-5, IL-6 e IL-10 estão envolvidas tanto nos processos inflamatórios como de hiperalgesia.

Efeito Edematizante

A habilidade de administrar PLA₂ exogenamente para gerar resposta inflamatória local foi primeiro reportada por Brain e Whittle (1977) que mostraram que PLA₂s isoladas a partir de venenos de *Vipera russeli* e *Crotalus durissus terrificus* induzia edema em patas de camundongos e liberaria dos mastócitos histamina *in vitro*. Estudos sugeriram que além de histamina e serotonina, substâncias vasoativas tais como prostaglândinas poderiam mediar à formação de edema local em resposta a PLA₂ de veneno de serpente (Bonta et al., 1979).

Além disso, atividade edematizante e liberação de histamina induzida pelas fosfolipases A_2 de venenos de *Naja naja* e *Crotalus durissus terrificus* foram correlacionados com a atividade enzimática através de mecanismos Ca²⁺ dependentes, suportando então o papel da atividade catalítica e a liberação de mediadores lipídicos no desenvolvimento de reações inflamatórias locais induzidas por essas proteínas (Gutiérrez e Lomonte, 1995).

Também tem sido mostrado que PLA_2 homóloga K49 procedente de *Bothrops atrox*, é capaz de induzir tanto um efeito edematizante, como é capaz de aumentar os níveis de IL-6 (Nunez et al., 2004).

Em relação à atividade edematizante, a BthTX II, uma PLA₂ Asp49, isolada a partir de venenos de *Bothrops jararacussu* tem sido evidenciada por induzir edema de pata e de pele em camundongos bem como a liberação *in vitro* de serotonina a partir de mastócitos peritoniais (Landucci et al., 2000). Esses resultados sugerem que em algumas PLA₂s, a atividade catalítica possui um papel importante, mais não determinante no efeito edematizante.

Entretanto, a PLA₂ isolada de veneno de *Bothrops neuwiedi* mostrou indução de edema na ausência de atividade catalítica, descartando o papel da atividade enzimática na formação de edema (Ownby et al., 1999).

Essas observações suportam a concepção de que PLA₂ apresenta sítios farmacológicos além da região catalítica, já estabelecido por Kini, (2003).

2. Objetivos

2.1 Purificação de uma isoforma de PLA_2 a partir do veneno total de *Bothrops moojeni*, empregando cromatografia de alta eficiência em sistema de HPLC de fase reversa.

2.2 Caracterização físico-química da isoforma BmTX-I proveniente da purificação do veneno total de *Bothrops moojeni* através de:

- Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)
- Espectrometria de massas (MALDI-Tof)
- Composição de aminoácidos (Sistema PICO-TAG)
- Determinação da região N-terminal

• Estudo da cinética enzimática, incluindo efeito da concentração do substrato, pH, temperatura, íons divalentes e medida da atividade inibitória de crotapotinas

2.3 Caracterização biológica da isoforma BmTX-I proveniente da purificação do veneno total de *Bothrops moojeni* através de:

- Atividade neurotóxica *in vitro* em músculo biventer cervicis de pintainho
- Atividade miotóxica através da determinação dos níveis de CK plasmáticos
- Atividade inflamatória através de edema de pata
- Atividade inflamatória através da quantificação de interleucina 6 (IL-6)

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados pintainhos da linhagem HY LINE W36, com peso entre 40 e 50 g (4 a 8 dias), fornecidos pela Granja Ito S/A, e camundongos fêmeas da linhagem SWISS, com peso entre 18 e 20 g, fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp. Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração, em ambiente com temperatura e iluminação controlada (12 horas com luz e 12 horas sem luz). Todos os experimentos foram feitos de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, protocolo nº 1040-1.

3.2 Venenos e reagentes

O veneno total de *Bothrops moojeni* foi adquirido do Serpentário Proteínas Bioativas Ltda (Fazenda Boa Esperança, Batatais, São Paulo).

Todos os produtos químicos utilizados foram de grau HPLC, grau seqüência ou de alto grau de pureza, obtidos da Sigma- Aldrich Brasil, Merk e Bio Rad.

3.3 Purificação em HPLC de fase reversa

As toxinas foram purificadas a partir do veneno total (5mg) em uma coluna μ -Bondapak C-18 analítica (0,78 X 30 cm Waters), previamente equilibrada com Tampão A (ácido trifluoracético 0,1%, pH 3,5), acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa - PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, e um injetor automático de amostras U6K com um "loop" de 200 μ l. A toxina foi eluída em um gradiente linear de tampão B (acetonitrila 66% + 0,1% de ácido trifluoroacético TFA), a um fluxo de 1ml/min. O perfil de eluição foi monitorado a 280nm e as frações coletadas, liofilizadas e estocadas a -20°C.

3.4 Eletroforese em PAGE-SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Schägger e Von Jagow (1987), em que as placas de poliacrilamida (PAGE) foram feitas de modo descontínuo. O gel de concentração de 5% e um gel de corrida de 12,5% de acrilamida estoque. Para o gel de concentração, foi usado o tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, enquanto que para o gel de corrida foi usado o tampão Tris-HCl 1,0M, pH 8,8. Em ambos os géis foram acrescentados 0,1ml (v/v) de SDS 20%.

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

3.5 Determinação da atividade PLA₂

A determinação da atividade fosfolipásica foi realizada segundo os métodos descritos por Cho e Kézdy (1991) e Holzer e Mackessy (1996), modificado por Ponce-Soto et al., (2002), utilizando como substrato o ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico 3mM, dissolvido em acetonitrila.

Foram utilizadas amostras com uma concentração de 1mg/ml tanto de veneno total como de fosfolipase A₂ purificada. As amostras foram incubadas junto com o substrato, água e o tampão de reação Tris-HCl 10mM pH 8 contendo CaCl₂ 10mM e NaCl 100mM, em um volume final de 260 µl por 20 minutos a 37°C. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e a atividade foi monitorada em absorbância a 425 nm com a liberação do cromóforo, utilizando-se um leitor de placas VersaMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA. USA.). Uma unidade de atividade enzimática é definida como quantidade de enzima necessária para produzir 1nmol de cromóforo por minuto.

A atividade especifica é dado pela relação entre a unidade enzimática (em nmol/min) e o teor de proteína (em mg).

3.6 Cinética enzimática

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

3.6.1 Efeito da temperatura

O teste foi realizado nas mesmas condições descritas no método 3.5 com ensaio padrão contendo: 20 µl de substrato, 20µl de água deionizada, 200µl de tampão Tris-HCl 10mM, pH 8, contendo CaCl₂ 10mM, NaCl 100mM e 20µl de PLA₂. A variação de temperatura foi de 25-45°C.

3.6.2 Efeito do pH

O ensaio para verificação do efeito do pH sobre atividade da PLA₂ foi realizado em meios de reações preparadas com diferentes valores de pH (4-10). A atividade foi determinada como descrito em 3.5, e foi feito um controle para todos os pHs. A concentração de enzima utilizada foi idêntica a do item 3.5. Os tampões utilizados foram: tampão citrato de sódio-HCl (pHs 4,5; 5 e 5,5); tampão fosfato-NaCl (pHs 6; 6,5; 7 e 7,5); tampão Tris-HCl (pHs 8 e 8,5); e tampão glicina-NaOH (pHs 9; 9,5 e 10).

3.6.3 Efeito de íons divalentes

A atividade das PLA₂ na presença de íons bivalentes (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+}) foi determinada de acordo com o método 3.5.

3.6.4 Efeito inibitório por crotapotinas crotálicas

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

3.7 Análise de espectrometria de massas por Maldi-Tof (MS)

A massa molecular da toxina foi analisada por Espectrometria de Massas, utilizando-se um Voyager DE PRO MALDI TOF mass spectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foi misturado 1µl da amostra dissolvida em TFA 0,1% em 2 µl da matriz. A matriz é preparada com ácido α -ciano-4-hidroxi-cinamico (Sigma), 60% acetonitrila e 0,1% v/v de TFA. A massa foi analisada sob as condições seguintes: aceleração de voltagem 25 kV, laser ajustado a 2890 mJ/com² em 300 ns, modo de análise linear.

3.8 Análise de aminoácidos

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

3.9 Determinação da região N-terminal

A sequência de aminoácidos das toxinas foi obtida pelo sequênciamento da região Nterminal da proteína reduzida e carboximetilada.

O seqüênciamento automático da região N-terminal foi feito em um seqüenciador automático modelo Procise f da Applied Biosystem. Os PTH aminoácidos foram identificados em um analisador automático de PTH aminoácidos modelo 120 A (Applied Biosystem), de acordo com o tempo de retenção dos 20 PTH aminoácidos padrões.

3.10 Atividades Farmacológicas

3.10.1 Atividade neurotóxica em músculo biventer cervicis de pintainho

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método de Ginsborg e Warriner (1960). Os pintainhos foram anestesiados com halotano e, após o isolamento, o músculo foi suspenso em um banho de 5ml (Automatic organ multiple-bath LE01 Letica Scientific Instruments. Barcelona, Spain), contendo solução nutritiva de Krebs, com a seguinte composição em mM: NaCl 118,6; KCl 4,69; CaCl₂ 1,88; KH₂PO₄ 1,17; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ e C₆H₁₂O₆ 11,65. A solução foi aerada de modo constante com carbogênio (mistura 95% O2 e 5% CO₂) e mantida a 37° C. A preparação foi submetida a uma tensão constante de 1g e estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo).

Foram aplicados pulsos supramaximais de 0,1 Hz de freqüência e 0,2 ms de duração (estimulador MAIN BOX LE 12404 Panlab s.l. Powerlab AD Instruments Barcelona, Spain). As contrações musculares máximas resultantes de estímulos elétricos e as contraturas em resposta à adição de KCl (20 mM) e ACh (110 μ M) foram registradas por meio de transdutores isométricos (Model MLT0201 Force transducer 5mg-25g Panlab s.l. AD Instruments Pty Ltd. Spain) conectados a um PowerLab/4SP (OUAD Bridge AD Instruments, Barcelona, Spain).

Os registros das contraturas para KCl e ACh foram realizados com ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição de veneno) e no final do experimento (após 120 min de incubação com o veneno). As concentrações de toxinas isoladas utilizadas foram 10, 50 e 100 µg/ml.

3.10.2 Atividade miotóxica através da determinação dos níveis de CK plasmáticos em camundongos

As doses inoculadas no músculo tibial tanto de veneno como da fração PLA₂ purificada foram 10 e 20 µg. Foram dosados os níveis de CK plasmáticos após 1, 3 e 8 horas. O kit comercial utilizado foi CK – Nac (Laborlab, Campinas, Brasil). A 250µl do substrato preparado, foram acrescentados 4µL do plasma obtido por centrifugação do sangue retirado via punção cardíaca de grupos de cinco camundongos de 18 a 20 g peso. Foi incubado por 2 minutos e lida a absorbância em 430 nm; posteriormente multiplicou-se pelo fator 8095 (Laborlab, Campinas, Brasil).

3.10.3 Atividade inflamatória através de edema de pata em camundongos

Grupo de cinco animais (18-20 g) receberam na pata direita uma injeção subcutânea (s.c) de veneno total e da fração BmTX-I, 5 e 10 μ g em 20 μ l de PBS. O grupo controle recebeu apenas 20 μ l de PBS. O edema formado foi medido 0,5, 1, 3, 6 e 24 horas após a injeção das toxinas. A porcentagem de edema formado tanto pelo veneno total quanto pela BmTX-I foi comparado com o grupo controle.

3.10.4 Atividade Inflamatória através da quantificação de interleucina 6 (IL-6) em camundongos

Em grupos de cinco camundongos (18-20g) foram administradas via intramuscular (i.m.) doses de 10 e 20 µg de veneno total da fração BmTX-I no músculo tibial. Amostras de sangue foram coletadas após 1, 3 e 8 horas da administração através de punção cardíaca. Os níveis de interleucina-6 (IL-6) no plasma foram quantificados por imunoensaios enzimáticos (R&D Quantikine) usando IL-6 padrão de camundongo.

3.11 Análise Estatística

Cada protocolo experimental (miografias, determinação de CK, determinação de IL-6 e edema de pata) foi repetido pelo menos 5 vezes, e os resultados reportados como a média \pm erro padrão. ANOVA seguido por teste múltiplo "Tukey-Kramer" foi usado para comparação estatística dos dados (análise de significância). O valor de p < 0.05 foi considerado significante.

4. Resultados

4.1 Perfil cromatográfico da PLA₂ BmTX-I isolada a partir do veneno total de *Bothrops moojeni* **através de sistema de HPLC utilizando coluna de fase reversa**

O veneno total foi aplicado em uma coluna de hidrofobicidade (μ-BondaPak C-18 Waters). O perfil cromatográfico mostra a presença de 13 frações denominadas como Bmoj-1 até Bmoj-13. A nova fração caracterizada foi a Bmoj-8, agora denominada como PLA₂ BmTX-I conforme mostrado na Figura 1.

A nova fração foi eluída no tempo de retenção de aproximadamente $38,9 \pm 0,5$ min e em uma concentração de $58,5 \pm 0,4$ de tampão B (acetonitrila 66% + TFA 0,1%).



Figura 1. Cromatografia em Sistema de HPLC- fase reversa do veneno de *Bothrops moojeni*. 5mg do veneno foi dissolvido no tampão inicial e eluído em gradiente linear contínuo de 60 min com tampão B (Acetonitrila 60%, TFA 0,1%), utilizando uma coluna μ -Bondapak C-18 analítica (Waters). PLA₂ BmTX-I indicada pela área sombreada. O monitoramento da absorbância foi realizado a 280 nm. O fluxo foi mantido constante a 1 ml/min.

4.2 Confirmação do grau de pureza da PLA₂ BmTX-I através de sistema de cromatografia em HPLC utilizando coluna de fase reversa

A nova PLA₂ BmTX-I obtida em um passo cromatográfico, foi, repassada em um sistema de HPLC utilizando uma coluna de fase reversa. O perfíl mostra a presença de apenas um pico protéico evidenciando o alto grau de pureza, conforme mostrado na Figura 2.

A PLA₂ BmTX-I foi eluída no tempo de retenção de $33,5 \pm 0,2$ min e em uma concentração de $55,2 \pm 0,3\%$ de tampão B (acetonitrila 66% + TFA 0,1%).



Figura 2 Cromatografia em sistema de HPLC-fase reversa para confirmação do grau de pureza da PLA_2 BmTX-I, utilizando uma coluna μ -Bondapak C-18 (Waters). A eluição da amostra foi realizada, usando um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (Acetonitrila 60%, TFA 0,1%). O monitoramento da absorbância foi realizado a 280 nm. O fluxo foi mantido constante a 1 ml/min.

4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio - SDS-PAGE

O perfil da massa molecular em SDS PAGE, do veneno total *Bothrops moojeni*, da fração BmTX-I e da fração BmTX-I reduzida com DTT, pista 2, 3 e 4 respectivamente é mostrado na Figura 3. A PLA₂ BmTX-I em condições não reduzidas (Figura 3, pista 3) mostrou a presença de duas bandas protéicas com massas moleculares de 28 e 14 kDa em relação aos marcadores de massa molecular. A PLA₂ BmTX-I em condições reduzidas (Figura 3, pista 4) mostrou a presença de uma única banda protéica com massa molecular de 14 kDa determinada em relação aos marcadores de massa molecular.



Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%). SDS-PAGE, corado com comassie blue. Pista 1 Marcadores de massa molecular, Pista 2 veneno total, Pista 3 BmTX-I sem reduzir e Pista 4 BmTX-I reduzida com DTT.

4.4 Estudos cinéticos da PLA₂ BmTX-I

4.4.1 Medida da atividade PLA2 do veneno total e da BmTX-I

A medida da atividade fosfolipásica A₂ (PLA₂) foi examinada utilizando o substrato cromogênico sintético e laminar ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico.

A atividade PLA₂ para o veneno total foi de $0,39 \pm 0,005$ nmoles/min; e para a nova fração BmTX-I foi de $6,25\pm 0,01$ (Figura 4).



Figura 4. Atividade PLA_2 proveniente do veneno total (V.T.) e da nova PLA_2 BmTX-I utilizando como substrato o ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

4.4.2 Efeito da concentração do substrato na atividade PLA₂ da BmTX-I

O efeito da concentração do substrato na atividade PLA₂ da BmTX-I sobre o substrato ácido benzóico mostrou que a PLA₂ tem um comportamento com tendência alostérica devido ao perfil de curva apresentado (Figura 5).



Figura 5. Efeito da concentração do substrato ácido 4-nitro-3- (octanoiloxi) benzóico na atividade PLA₂ da BmTX-I. O ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.5 variando-se a concentração de substrato. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

4.4.3 Efeito do pH na atividade da isoforma PLA₂ BmTX-I

O pH ótimo da PLA₂ BmTX-I, foi determinado, incubando a enzima em diferentes pHs (4-10) sendo feito um controle para cada pH. O pH ótimo para a PLA₂ BmTX-I foi 8.0 como mostrado na Figura 6.



Figura 6. Efeito da variação de pH sobre a atividade PLA_2 da BmTX-I. O ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.5 e os tampões utilizados na concentração de 10 mM, foram: Citrato de sódio-HCl (pHs 4,5;5 e 5,5); tampão fosfato-NACl (pHs 6; 6,5; 7 e 7,5), tampão Tris-HCl (pHs 8 e 8,5); e tampão glicina-NaOH (pHs 9; 9,5 e 10). O tempo de reação foi de 20 minutos a 37°C. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

4.4.4 Efeito da temperatura na atividade da PLA₂BmTX-I

O efeito da temperatura na atividade da PLA₂ BmTX-I, foi determinado incubando a enzima em diferentes temperaturas (25-45°C). A atividade ótima da BmTX-I foi registrada em torno de 37°C de acordo com a Figura 7.



Figura 7. Efeito da variação temperatura sobre a atividade PLA_2 da BmTX-I. O ensaio foi realizado nas mesmas condições descritas no método 3,5. A temperatura, variada de 25-45 °C, foi mantida por 20 minutos e em seguida feita a leitura a 425nm.

4.4.5 Efeito de íons divalentes na atividade PLA₂ da BmTX-I

A atividade da PLA₂ BmTX-I foi determinada na presença de alguns íons, como Mg²⁺, Cd²⁺ e Mn²⁺ em uma concentração de 10 mM, na presença e na ausência de 1mM de Ca²⁺. E avaliou-se também a atividade da PLA₂ BmTX-I com 0, 1 e 10 mM de Ca²⁺.

A PLA₂ BmTX-I apresentou atividade enzimática semelhante na presença de 1 e 10 mM de Ca²⁺. Entretanto na presença dos íons Mg^{2+} , Cd^{2+} e Mn^{2+} (10mM) a atividade foi diminuída na presença de 1mM de Ca²⁺. Na ausência de Ca²⁺ e na presença dos íons Mg^{2+} , Cd^{2+} e Mn^{2+} (10mM) a atividade PLA₂ foi significativamente (*) diminuída mostrando que esses cátions não podem substituir o Ca²⁺ de acordo com a Figura 8.



Figura 8. Influência de íons na atividade da PLA₂ BmTX-I. O ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.5, utilizando tampões: Tris-HCl (10mM), contendo os íons Mg^{2+} , Cd^{2+} e Mn^{2+} (10 mM), NaCl (100mM), com concentração de CaCl₂ subótimas (1mM) e na ausência de CaCl₂. O tempo de reação foi de 20 minutos a 37°C. (*) atividade catalítica significativamente diminuída.

4.4.6 Medida da atividade inibitória das isoformas de crotapotina (F3 e F4) de *Crotalus durissus collilineatus* **sobre a atividade PLA₂ da BmTX-I**

A inibição da atividade PLA₂ da BmTX-I, pelas isoformas de crotapotina de *Crotalus durrissus collilineatus* (F3 e F4), foi determinada incubando cada uma delas com a PLA₂ BmTX-I na razão molar de 1:1 por 20 minutos a 37°C.

As crotapotinas F3 e F4 foram capazes de inibir a atividade PLA₂ em aproximadamente 50% (F3 = $2,81 \pm 0,09$ nmoles/min/mg e F4 = $2,78 \pm 0,1$) como mostrado na Figura 9.



Figura 9. Inibição da PLA₂ BmTX-I pelas crotapotinas F3 e F4 de *Crotalus durrissus collilineatus*. Esse ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.5, incubando PLA₂ e crotapotinas por 30 minutos a 37°C e depois medindo a atividade enzimática residual.

4.5 Análise da composição de aminoácidos da PLA2 BmTX-I

A análise da composição de aminoácidos da PLA₂ BmTX-I de *Bothrops moojeni* (Tabela 1), mostra que não existem diferenças significativas com relação ao caráter das PLA₂.

A análise de composição global de aminoácidos mostra que se trata de uma proteína de caráter básico pela alta presença de Lys, His e Arg. As 14 cisteínas detectadas evidenciam a presença de 7 pontes dissulfeto, característica molecular desta família de proteína.

Aminoácido	Bm TX-I	%
Asx	13	10
Glx	11	9
Ser	3	2
Gly	10	8
His	2	2
Arg	6	5
Thr	6	5
Ala	6	5
Pro	7	5
Tyr	3	2
Val	5	4
Met	1	1
Cys	14	11
Ile	4	3
Leu	9	7
Phe	6	5
Lys	22	17
Trp	*ND	
Total	128	100

Tabela 1. Composição de aminoácidos da PLA₂ BmTX-I de *Bothrops moojeni*. Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteína. (*) Não determinado

4.6 Determinação da massa molecular por Espectrometria de Massas (MALDI Tof) da PLA₂ BmTX-I

Através desta análise, pode-se constatar o grau de pureza da PLA₂ BmTX-I de *Bothrops moojeni*, obtida a partir da cromatografia em HPLC de fase reversa (Waters).

A PLA₂ BmTX-I, apresentou uma massa molecular de 14238,71 Da, como mostrado na Figura 10, sendo que a determinação da massa molecular real mostra que não existe diferença significativa entre a massa determinada por eletroforese em SDS-PAGE e a análise por espectrometria de massas.

De acordo com o tipo de técnica empregada de espectrometria de massas (MALDI-Tof) (Figura 10), pode-se notar a presença de um pico de massa 14.238,71 Da.



Figura 10. A massa molecular da PLA₂ BmTX-I de *Bothrops moojeni* foi analisada por Espectrometria de Massas, utilizando-se um Voyager DE PRO Maldi-TOF mass spectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 1 μ l da amostra em TFA 0,1% foi misturada em 2 μ l da matriz. e analisada sob as condições seguintes: aceleração de voltagem 25 kV, o laser ajustado a 2890 mJ/com², em 300 ns e modo de análise linear.

4.7 Estudo da região N-terminal e estudo de homologia seqüencial da PLA2 Bm TX-I

A seqüência N-terminal da PLA₂ BmTX-I pode ser observada na figura 11, e em alinhamento com outras proteínas de seqüências já determinadas e registradas no banco de dados, demonstrou possuir um alto grau de homologia seqüencial.

A região encerrada da figura 11 representa a seqüência consenso entre as diferentes PLA₂ provenientes de serpentes, indicando tanto regiões altamente conservadas quanto variáveis.

Existem diferenças na posição de alguns aminoácidos entre a PLA₂ BmTX-I de *Bothrops moojeni*, na região N-terminal, como é o caso do aminoácido leucina por isoleucina na posição 16.

										10										20										30					
PLA ₂ BmTX-I	D	L	W	Q	F	G	Q	М	Ι	L	Κ	Ε	Т	G	Κ	Ι	Ρ	F	Ρ	Ŷ	Y	G	A	Y	G	С	Y	С	G	Ŵ	G	G	R	G	
BthTX II	D	L	W	Q	W	G	Q	М	Ι	L	Κ	Ε	Т	G	Κ	L	Ρ	F	Ρ	Y	Y	Т	Т	Y	G	С	Y	С	G	W	G	G.	R	G	
PLA ₂ Bj p	D	L	W	Q	F	G	Q	М	Ι	L	K	Ε	Т	G	Κ	L	P	F	Ρ	Y	Y	Т	Т	Y	G	С	Y	С	G,	W	G	G	Q	G	
PLA ₂	D	L	W	Q	F	G	К	М	Ι	L	Κ	Ε	Т	G	Κ	L	Ρ	F	Ρ	Y	Y	V	Т	Y	G	С	Y	С	G	V	G	G	R.	G	
PrTX-III c	D	L	W	Q	F	G	Q	М	Ι	L .	Κ	E	Т	G	Κ	L	Ρ	F	Ρ	Y	Y	Т	Y	G	G	C.	Y	С	G	٧	G	G	R	R	
PLA ₂ MPIII-4R	s	L	F	Ε	L	G	К	М	Ι	L	Q	E	Т	G	K	Ν	Ρ	A	Κ	s	Y	G	A	Y	G	c	N	С	G	V	L	G	R	G	
PLA ₂ Myo IIc	s	L	F	E	L	G	к	М	Ι	L	Q	E	Т	G	Κ	Ν	P	A	Κ	s	Y	G	A	Y	G	c	Ν	С	G	V	L	G	R	G	
BthTX I	s	L	F	Ε	L	G	К	М	Ι	L	Q	E	Т	G	Κ	Ν	Ρ	A	Κ	s	Y	G	A	Y	G	c	N	С	G	V	L	G	R	G	
PLA ₂ PrTX-II	s	L	F	Ε	L	G	K	М	Ι	L	Q	E	Т	G	Κ	N	P	A	Κ	s	Y	G	A	Y	G	С	Ν	С	G	V	L	G	R	G	

Figura 11. Alinhamento da região N-terminal da PLA₂ BmTX-I isolada de *Bothrops moojeni* com outras PLA₂ de seqüências obtidas de base de dados BLAST protein data bank (PubMed–Medline). BthTx-II – bothropstoxin II de *Bothrops jararacussu*, (Pereira et al., 1998), PLA₂ Bjp de *Bothrops jararacussu*, (Moura-da-Silva et al., 1995), PLA₂ PrTX-III c, de *Bothrops pirajai* (Rigden et al., 2003), PLA₂ MPIII-4R de *Bothrops pirajai* (Toyama et al., 2000), PLA₂ Myo IIc de *Bothrops asper* (Francis et al., 1991), PLA₂ Myotoxin II de *Bothrops asper*, BhTX-I de *Bothrops jararacussu* (Cintra et al., 1993) e PLA₂ PrTX-II de *Bothrops pirajai* (Toyama et al., 2000).

4.8 Estudo da atividade neurotóxica *in vitro* na preparação biventer cervicis de pintainho do veneno total de *Bothrops moojeni*

Neste experimento foram testadas as concentrações de 100, 50 e 10 µg/ml do veneno total e 50 e 10 µg/ml da PLA₂ purificada de *Bothrops moojeni*. Nos experimentos realizados para a determinação do tempo necessário do veneno total e da BmTX-I para a obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil do músculo esquelético biventer cervicis de pintainho, foram: para a dose de 100µg/ml de veneno total foi de $50 \pm 2,30$ min, para as doses de 50 e 10 µg/ml foi de 60 $\pm 3,1$ min e 70 $\pm 4,3$ min. respectivamente (Tabela 2). Para a BmTX-I o tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil foi de: 40 $\pm 2,58$ min para 50 µg/ml e 50 $\pm 3,45$ min para a concentração de 10 µg/ml (Tabela 3).

As Figuras 12 e 13 mostram a representação gráfica do bloqueio da resposta contrátil na transmissão neuromuscular na preparação biventer cervicis de pintainho. Em todas as doses usadas de veneno houve um bloqueio irreversível após lavagem com krebs.

As Figura 14 e 15 mostram o registro miográfico da resposta contrátil do veneno total de *Bothrops moojeni* e da BmTX-I respectivamente, evidenciando um bloqueio na transmissão neuromuscular bem como as respostas contraturantes à acetilcolina (ACh) e ao potássio na forma de KCl na preparação biventer cervicis de pintainho.

Tabela 2:	Tempo neo	cessário par	a obtenção	de 50% de	e bloqueio	da resposta	a contrátil o	do músculo	biventer
cervicis de	e pintainho	para as cond	centrações (do veneno	total de Be	othrops mo	ojeni.		

Concentração de Veneno total	Tempo para obtenção de 50% de bloqueio de resposta
	contrátil
10 µg/ml	$70 \pm 4,3 \min$
50 µg/ml	$60 \pm 3 \min$
100 µg/ml	$50 \pm 2,30 \min$

Tabela 3: Tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil do músculo biventer cervicis de pintainho para as concentrações da PLA₂ BmTX-I.

Concentração da BmTX-I	Tempo para obtenção de 50% de bloqueio de resposta
	contrátil
10 μg/ml	$50 \pm 3,45 \text{ min}$
50 µg/ml	$40 \pm 2,58 \text{ min}$



Figura 12. Representação gráfica do bloqueio da resposta contrátil na transmissão neuromuscular na preparação biventer cervicis de pintainho (Estímulo indireto) pela ação do veneno total de *Bothrops moojeni* nas doses de 100, 50 e 10 μ g/ml. O bloqueio neuromuscular foi dose-dependente. Cada ponto corresponde a media \pm erro padrão de 5 experimentos. Representação gráfica de 50 % do bloqueio da transmissão neuromuscular.



Figura 13. Representação gráfica do bloqueio da resposta contrátil na transmissão neuromuscular na preparação biventer cervicis de pintainho (Estímulo indireto) pela ação da BmTX-I nas doses de 50, 10 μ g/ml. O bloqueio neuromuscular foi dose-dependente. Cada ponto corresponde a media \pm erro padrão de 5 experimentos. Representação gráfica de 50 % do bloqueio da transmissão neuromuscular.



Figura 14. Resposta muscular na preparação de biventer cervicis de pintainho na presença do veneno total de *Bothrops moojeni*, nas concentrações de a) 100, b) 50 e c) 10 μ g/ml. A resposta contraturante da acetilcolina (ACh 110 μ M; *) e do KCl (20mM; **o**) foi obtida antes e depois da adição do veneno.



Figura 15. Resposta muscular na preparação biventer cervicis de pintainho na presença da fração BmTX-I, nas concentrações de a) 50 e b) 10 μ g/ml. A resposta contraturante da acetilcolina (ACh 110 μ M; *) e do KCl (20 mM; **o**) foi obtida ante e após a adição da fração BmTX-I.

4.9 Contraturas induzidas por Acetilcolina (ACh) e Potássio (KCl) em preparações biventer cervicis de pintainho (BCp) antes e após a adição do veneno

Com as maiores concentrações usadas (50 e 100 μ g/ml), o veneno alterou significantemente (p<0,05) a contratura induzida por ACh (110 μ M) e KCl (20 mM) quando comparado com o controle (Figura 16).

Com a menor concentração (10 μ g/ml) do veneno e com as concentrações usadas da fração BmTX-I não houve uma alteração significante das contraturas induzidas pela ACh e KCl quando comparado com o controle (Figura 17). Nas preparações controles, a contraturas induzidas pela ACh e KCl se mantiveram estáveis após 120 min de incubação sob estimulação indireta.



Figura 16. Porcentagem de bloqueio da resposta contraturante à acetilcolina (ACh) e ao potássio, na forma de KCl, com as dosagens de 100, 50 e 10 μ g/ml de veneno total de *Bothrops moojeni* em músculo biventer cervices de pintainho.



Figura 17. Porcentagem de bloqueio da resposta contraturante à acetilcolina (ACh) e ao potássio, na forma de KCl, com as dosagens de 50 e 10 μ g/ml da fração BmTX-I em músculo biventer cervices de pintainho.

4.10 Determinação dos níveis de CK plasmáticos in vivo intramuscular em camundongos

A figura 18 ilustra o perfil de liberação de CK para o veneno total de *Bothrops moojeni* (18A) e para a fração PLA₂ BmTX-I (18B) respectivamente. O comportamento de liberação de CK foi semelhante tanto para o veneno total como para a PLA₂ BmTX-I, os quais tiveram o maior liberação de CK uma hora após a injeção i.m. Oito horas após a injeção os níveis de CK já estavam similares aos do controle.

A dose de 20µg causou um aumento significativo de liberação de CK, para ambos, veneno 542,93±75,46 e BmTX-I 673,66±70,37 (1 hora) em relação ao controle que continha apenas PBS.



Figura 18. Representação gráfica da atividade miotóxica do veneno total (A) e da BmTX-I (B) de *Bothrops moojeni* inoculado em camundongo. Mostra-se o curso-temporal dos níveis de creatina quinase (CK) incrementados ao longo do tempo depois de administrado o veneno e a PLA₂ BmTX-I respectivamente (10 e 20 μ g). Intramuscular (n=5). Nível de significância da fração em relação ao controle (*p*<0,05).

4.11 Estudo da atividade inflamatória através da quantificação de interleucina 6

(IL-6) em camundongos

A resposta sistêmica de interleucina-6 (IL-6) foi induzida administrando 10 e 20 µg de veneno total e da PLA₂ BmTX-I de *Bothrops moojeni*. Como mostrado na figura 19 houve um aumento plasmático dos níveis dessa citocína tanto para o veneno total (Figura 19A) como para a BmTX-I (Figura 19B). Esse aumento teve um pico máximo 3 horas após a injeção tanto do veneno quanto da BmTX-I ocorrendo em seguida uma diminuição desses níveis.



Figura 19. Resposta sistêmica de IL-6 induzida pelo veneno total (A) e PLA₂ BmTX-I (B) de *Bothrops moojeni* em camundongos nas doses de 10 e 20 μ g (i.m) respectivamente.

4.12 Estudo da atividade inflamatória através de edema de pata

Foi estimada a ação inflamatória do veneno total e da PLA₂ BmTX-I procedente do veneno de *Bothrops moojeni in vivo*, através de edema de pata. Foram inoculadas as concentrações de 5 e 10 µg na região subplantar do camundongo. A figura 20 mostra a ação edematizante tanto do veneno total como da BmTX-I respectivamente, observando-se um comportamento próprio deste tipo de toxina. Após 24 horas, o efeito inflamatório diminui drasticamente até alcançar os níveis normais.



Figura 20. Representação gráfica da atividade inflamatória do veneno total e da BmTX-I de *Bothrops moojeni* inoculados na região subplantar do camundongo. O aumento do volume de inflamação atingida pela pata do animal ao longo do tempo, até 24 horas, sendo comparado com o controle e expressado em porcentagem de edema induzido. A dose aplicada para o veneno total foi de $10\mu g$ e para a BmTX-I foram de 5 e $10\mu g$ (n=5). Nível de significância das concentrações em relação ao controle (p < 0.05).

5. Discussão

Fosfolipases A₂ miotóxicas provenientes de venenos botrópicos podem ser divididas em dois grandes grupos: aquelas com atividade enzimática, as PLA₂s Asp49, e aquelas desprovidas de atividade catalítica, as PLA₂s Lys49 (Gutierréz e Lomonte,1995).

Lomonte e colaboradores (1990) reportaram um procedimento de dois passos cromatográficos para isolamento e caracterização parcial de duas PLA₂s Lys49 a partir do veneno total de *Bothrops moojeni* referidas como MjTX-I e MjTX-II.

No presente trabalho a purificação da nova PLA₂ Asp49, denominada BmTX-I, a partir do veneno de *Bothrops moojeni* foi realizada em um único passo cromatográfico utilizando um sistema de HPLC em coluna C18 de fase reversa (Figura 1).

Nossos resultados utilizando-se cromatografia de alta eficiência (HPLC de fase reversa) mostraram que o veneno total de *Bothrops moojeni* pode ser decomposto em 13 frações, dentre as quais uma nova isoforma de PLA₂ com atividade catalítica denominada BmTX-I foi identificada (Bmoj8). Para confirmação do grau de pureza a fração Bmoj8 foi re-purificada usando o mesmo sistema cromatográfico (Figura 2). A adequação metodológica utilizada neste trabalho permitiu apresentar a PLA₂ BmTX-I não descrita na literatura para o veneno de *Bothrops moojeni*.

O perfil eletroforético de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida (12,5%), da PLA₂ BmTX-I (Figura 3), revelou que em condições não redutoras a PLA₂ BmTX-I apresentou-se na forma de dímeros compatível com sua massa de 28 kDa, e quando reduzida com 1,4 dithiothritol (DTT) mostrou a presença de uma única banda protéica de massa molecular de 14 kDa. Esses resultados confirmam a tendência das PLA₂s em formar agregados multiméricos (Arni e Ward, 1996).

Estudos sobre o modelo estrutural das PLA₂s mostram que as mesmas podem apresentar estruturas monoméricas (Scott et al, 1997), diméricas e triméricas (Arni e Ward, 1996).

A atividade PLA₂ do veneno de *Bothrops moojeni* e da PLA₂ BmTX-I foi analisada utilizando um substrato sintético denominado ácido 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzóico (Holzer e Mackessy, 1996). A atividade fosfolipásica (Figura 4) mostrou ser maior para a BmTX-I quando comparada com o veneno total, sendo a velocidade de reação $6,25 \pm 0,01$ nmoles/min para a BmTX-I e $0,39 \pm 0,005$ nmoles/min para o veneno total. Esses valores são correspondentes de PLA₂ com atividade catalítica o que evidencia a presença do aminoácido aspartato na posição 49 da cadeia polipeptídica podendo ser classificado como uma PLA₂ Asp49 como aquelas descritas para veneno botrópicos: BthTx-II – bothropstoxin II de *Bothrops jararacussu*, (Pereira et al., 1998), PLA₂ PrTX-III c, de *Bothrops pirajai* (Rigden et al., 2003).

As PLA₂ (E.C.3.1.1.4) provenientes do veneno de serpentes são consideradas como PLA₂ de baixa massa molecular, extracelulares, e hidrolisam substratos em forma micelar ou de lipídios dispersos. Porém PLA₂s exibem um grande aumento de sua atividade catalítica quando fosfolipídios monoméricos se agregam para formar micelas (Breithaupt, 1976; Holzer e Mackessy, 1996; Deems e Dennis, 2000)

Com relação ao efeito da concentração do substrato, a BmTX-I mostrou comportamento do tipo alostérico, devido ao perfil de curva sigmoidal apresentado (Figura 5).

Não se pode afirmar que a PLA₂ BmTX-I seja necessariamente alostérica pois, este resultado foi obtido frente a um substrato cromogênico e linear, 3-nitro 4-(octanoyloxy) ácido benzóico, ou seja, um substrato que não se agrega para formar micelas o que poderia explicar a baixa atividade enzimática frente a baixa concentrações de substrato.

Porém as PLA₂s apresentam uma tendência em formar agregados, dímeros, trímeros (Arni e Ward, 1996) proporcionando um efeito conhecido como cooperatividade, também característico de enzimas alostéricas, o que reforçaria a possibilidade desta enzima ter um comportamento com tendência alostérica corroborando assim com o resultado obtido por SDS-PAGE (Figura 3), que mostra a BmTX-I com essa tendência em agregar-se. Alguns trabalhos a respeito de PLA₂ Asp49 provenientes de serpentes crotálicas mostram que estas PLA₂s apresentam esse comportamento (Beghini et al., 2000; Ponce-Soto et al., 2002) o mesmo ocorrendo para uma PLA₂ básica procedente de *Bothrops jararacussu* (Bonfim et al, 2001).

Com relação ao estudo cinético a atividade PLA₂ pode ser verificada frente a diferentes faixas de pH; o pH ótimo para as PLA₂s em estudo mostra ser comum entre si, cujos valores ótimos se encontram entre 7 e 8,5 (Kini, 1997; Breithaupt, 1976). Assim temos que a BmTX-I pode ser considerada básica ao evidenciar sua atividade ótima em pH de 8.0 (Figura 6).

Outro parâmetro cinético utilizado para se caracterizar PLA₂ (Asp49) é a temperatura. Tem sido registrado que a PLA₂ de *Naja naja naja* é altamente estável à temperaturas extremas, tal como 100°C (Kini, 1997), assim como a PLA₂ de *Crotalus durissus terrificus* que mostra uma alta atividade em temperatura em torno de 53-57°C (Breithaupt, 1976); a temperatura ótima para atividade da BmTX-I foi em torno de 37°C, e mesmo a 40-45°C, esta ainda não havia sofrido uma queda brusca na sua atividade (Figura 7). Os resultados de pH e temperatura ótimos corroboram que a fração de BmTX-I purificada deva estar entre os grupos das PLA₂s Asp49.

A BmTX-I mostrou ser uma PLA₂ Ca²⁺ dependente como outras PLA₂s Asp49, já que na ausência de Ca²⁺ a mesma perde totalmente sua atividade catalítica. A BmTX-I apresentou atividade com apenas 1mM de Ca²⁺ (Figura 8). Ao adicionar íons Mg²⁺, Cd²⁺ e Mn²⁺ (10 mM)

em presença de 1mM de Ca²⁺ ocorreu uma diminuição da atividade catalítica. A substituição de 10 mM Ca²⁺ por 10 mM dos outros cátions reduziu a atividade para níveis similares aos encontrado na ausência de Ca²⁺, indicando que estes cátions não podem substituir o Ca²⁺, Beghini e colaboradores (2000) observaram o mesmo para PLA₂ do veneno de *C. durissus cascavella*. O íon Ca²⁺ direciona o posicionamento do substrato no sitio ativo da enzima e parece que esse arranjo do sitio catalítico apresenta uma estrutura exclusiva para o Ca²⁺ o que explicaria a diminuição da atividade PLA₂ na presença de outros íons.

As fosfolipases A_2 crotálicas são consideradas proteínas heterodiméricas (Breithaupt, 1976), sendo composta por uma subunidade básica com atividade catalítica (PLA₂) e uma subunidade ácida sem atividade catalítica denominada crotapotina. O resultado é um complexo fosfolipase-crotapotina denominado crotoxina. A crotapotina potencializa a toxicidade e inibe a atividade enzimática das fosfolípases A_2 crotálicas (Rubsamen et al, 1971).

As isoformas de crotapotina do veneno de *Crotalus durrissus collilineatus* (F3 e F4) inibiram significativamente a atividade catalítica da PLA₂ BmTX-I em aproximadamente 50% (Figura 9). Nossos resultados estão em concordância com os resultados encontrados por Landucci *et al.* (2000), os quais observaram que crotapotinas poderiam inibir PLA₂s pancreáticas, de abelhas e de outros venenos de serpentes e Bonfim et al (2001) que reportaram que crotapotinas dos venenos de *C. durissus terrificus* (F7), *C. d. collilineatus* (F3 e F4) e de *C. durissus cascavella* (F3 e F4) diminuíram a atividade catalítica da PLA₂ BjIV purificada do veneno de *B. jararacussu*.

Os estudos obtidos por espectrometria de massas (Maldi-Tof) mostram que a PLA₂ BmTX-I apresenta um alto grau de pureza e homogeneidade molecular (Figura 10), sendo sua massa molecular de 14.231,78 Da diferente da MjTX-I (13,669kDa) (Soares, et al., 1997) e da MjTX-II (14 kDa) (Soares et al., 1998), resultados que sugerem a presença de uma nova fração que apresenta atividade PLA₂.

A presença de resíduos carregados positivamente tais como Lisina, Histidina e Arginina tanto nas PLA₂s Asp49 quanto nas Lys49 estão relacionados com possíveis efeitos farmacológicos como miotoxicidade e citotoxicidade (Gutierrez e Lomonte, 1995).

Em nossos resultados, a análise da composição de aminoácidos da BmTX-I (Tabela 1) apresentou um importante nível de homologia com outras PLA₂s procedentes do veneno botrópico. A análise da composição de aminoácidos mostra a presença de uma grande quantidade de aminoácidos tanto de caráter básico quanto hidrofóbico; a presença de 14 Cys é indicativo de

7 pontes dissulfeto, as quais estabilizam a estrutura terciária da proteína, que é constituída de 128 resíduos de aminoácidos.

A análise da seqüência da região N-terminal (Figura 11) mostrou que a BmTX-I possui homologia seqüencial com outras PLA₂s botrópicas, tais como: BthTx-II – bothropstoxin II de *Bothrops jararacussu*, (Pereira et al., 1998) e a PLA₂ PrTX-III c, de *Bothrops pirajai* (Rigden, D.J., et al., 2003). Estudos de homologia seqüencial têm mostrado que existem determinadas posições extremamente conservadas nas PLA₂s. Na posição 1 e 2 predomina a seqüência de aminoácidos (SL), na posição 4 (Q), na posição 7 a 10 (KMIL), na posição 12 e 13 (ET), na posição 21 (Y), na posição 25-26 e 28-29 (GC e CG). Nas PLA₂s Asp49 existem vários resíduos conservados que também possuem um papel crucial na expressão da atividade PLA₂. Assim temos que as seqüências de aminoácidos W/YCG-G (27, 28, 29 e 30) são essenciais para a formação da alça de ligação do cálcio (Arni e Ward, 1996).

De acordo com o estudo de homologia seqüencial realizado com a BmTX-I, existem algumas diferenças detectáveis, por exemplo, a substituição de (S) por (D) na posição 1; (L) por (I) na posição 16. Apesar destas mudanças, não houve diminuição da atividade catalítica nem farmacológica. Tais mudanças provavelmente podem estar relacionadas com alguns outros efeitos biológicos que não foram tratados no presente trabalho.

Neurotoxinas de veneno de serpentes que causam paralisia neuromuscular atuam tanto préjuncionalmente por bloquearem a liberação de acetilcolina (ACh) ou pós-juncionalmente por bloquearem os receptores nicotínicos. Estes diferentes mecanismos de ação não podem ser facilmente diferenciados usando preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (PNDp), mas eles podem ser diferenciados usando preparação biventer cervicis de pintainho (BCp) (Rodriguez-Acosta, 2001).

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

No entanto, como regra, os venenos bem como suas toxinas atuam perifericamente na junção neuromuscular. Assim, estudos têm mostrado que espécies botrópicas possuem efeito neurotóxico *in vitro*, como o reportado por Costa et al (1999) que evidenciaram que o veneno de

Bothrops pirajai possui um efeito miotóxico e neurotóxico *in vitro*, capaz de bloquear a resposta contrátil na preparação extensor digitorum longus (EDL) de rato.

Cogo et al (1993) mostraram que o veneno de *Bothrops insularis* também possui um efeito neurotóxico *in vitro* na preparação músculo biventer cervicis de pintainho em concentrações que não afetam as respostas contraturantes a ACh e ao KCl e nem mesmo interfere sobre a liberação de CK.

Posteriormente, Araújo et al (2003) também observaram que tanto o veneno como uma fração caseinolítica de *Bothrops lanceolatus* possui um efeito neurotóxico *in vitro* sobre a preparação músculo biventer cervicis de pintainho, assim como os estudos eletrofisiológicos mostraram que o veneno total é capaz de aumentar ligeiramente a amplitude e freqüência dos potencias de placa em miniatura (PPM).

Em nossos resultados reportamos a atividade neurotóxica *in vitro* do veneno total de *Bothrops moojeni* (Figura 12) usando como modelo a preparação biventer cervicis de pintainho (BCp). A caracterização neurotóxica *in vitro* feita a partir do veneno total de *Bothrops moojeni*, e da fração BmTX-I no modelo biventer cervicis de pintainho mostrou que o veneno de *Bothrops moojeni* é menos ativo que os venenos crotálicos, já que estes últimos levam a um bloqueio da transmissão neuromuscular muito mais rapidamente e usando-se baixas concentrações; no entanto, não se pode negar que o veneno botrópico exibe também uma ação neurotóxica *in vitro*.

Os resultados mostraram que o completo bloqueio com 10 µg/ml de veneno não foi acompanhado pela inibição das respostas ao potássio (KCl) e a acetilcolina (ACh). O mesmo acorreu com as duas concentrações (50 e 10 µg/ml) da fração BmTX-I. Neurotoxinas ativas présinapticamente são capazes de abolir a resposta contrátil sem afetar a resposta aos agonistas colinérgicos (Lewis e Gutmann, 2004). Estas observações sugerem que em baixas concentrações, o veneno de *Bothrops moojeni* não teve efeito inibitório nos receptores pós-sinápticos colinérgicos e nem causou dano muscular que impedisse a contratura em resposta ao KCl.

Entretanto, em altas concentrações do veneno (50 e 100µg/ml) uma contratura muscular, concomitante com a inibição da resposta a ACh e KCl, foi observada, apontando para um efeito pós-sináptico no receptor nicotínico e na membrana muscular (sarcolema). O fato do veneno total de *Bothrops moojeni* não afetar significantemente a resposta a ACh e KCl, a não ser em altas doses, sugere sua natureza pré-sináptica primordial. Desta maneira, o veneno de *Bothrops moojeni* se comporta como o veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Rodrigues-Simioni et al.,

2004) que com 10 μg/ml não inibe a resposta a ACh, indicando assim uma ação preponderantemente pré-sináptica.

As PLA₂ presentes nos venenos de serpentes exibem uma ampla variedade de efeitos farmacológicos. No estudo da relação estrutura-função, é importante analisar seus efeitos farmacológicos *in vivo*, ao invés de *in vitro*. Os estudos *in vitro* às vezes evidenciam efeitos não específicos devido à atividade enzimática inerente, levando à conclusões errôneas. Só em alguns casos os efeitos farmacológicos podem ser analisados em sistemas *in vitro* como, por exemplo, em cultura celular (Lomonte, et al., 2003).

Nossos estudos de miotoxicidade e efeito inflamatório através de edema de pata e de quantificação de IL-6 *in vivo* permitiram analisar melhor os efeitos do veneno e da PLA₂ BmTX-I de *Bothrops moojeni*.

Miotoxinas de serpentes, normalmente são proteínas pequenas e/ou peptídeos, e geralmente podem ser definidas como componentes naturais de secreções de glândula de veneno que induz injuria no local da mordida, o que pode causar permanentes danos no tecido muscular, inaptidão e amputação de membros afetados (Rosenfeld, 1971). Desta forma, um interesse crescente em componentes do veneno responsáveis pela mionecrose e seu modo de ação tem acontecido durante as últimas décadas (Gutiérrez e Ownby, 2003).

PLA₂s provenientes de veneno de serpente tem sido largamente empregadas como ferramentas farmacológicas para investigar seu papel em diversos processos fisiopatológicos. Segundo proposto por Gutierrez e Ownby (2003), as PLA₂ são os componentes miotóxicos mais importantes nos venenos de serpentes, induzindo eventos de degeneração muscular. As PLA₂s miotóxicas ligam-se aos aceptores da membrana plasmática, os quais poderiam se tratar de lipídeos ou proteínas, podendo diferir de sua afinidade pelas PLA₂.

A partir dessa ligação as PLA_2 s miotóxicas produzem uma destruição da membrana através de mecanismos catalíticos ou mecanismos independentes de atividade PLA_2 , no entanto, provocam uma entrada de Ca^{2+} bastante pronunciada e que, por sua vez, produzem uma série de eventos degenerativos associados com uma hipercontração, ativação de calpinas e PLA_2 citosólicas e mitocondriais Ca^{2+} -dependentes.

Em nossos estudos de miotoxicidade do veneno total e da PLA₂ BmTX-I de *Bothrops moojeni*, evidenciamos um efeito miotóxico *in vivo*, devido ao aumento dos níveis plasmáticos de creatina quinase (CK), quando administrados via intramuscular (i.m) em camundongo (Figuras

18A e 18B), revelando deste modo um dano muscular de forma dose-dependente o qual alcançou o máximo 1h após a injeção. Estes resultados corroboram plenamente com a hipótese estabelecida por Gutierrez e Ownby (2003), revelando que a PLA₂ F6 de *Crotalus durissus collilineatus* é a responsável pela miotoxicidade no veneno, e ela é altamente específica, não sendo seqüestrada por nenhum tipo de aceptores na corrente sangüínea ao unir-se com uma alta afinidade a receptores presentes no músculo esquelético de camundongo.

Inflamação é uma reação de injuria tecidual a qual é uma importante característica do envenenamento por serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae (Rosenfeld, 1971). É uma resposta protetora a qual possui um conjunto de estágios para recuperação e reconstituição da função normal do tecido lesado. A reação inflamatória é mediada endogenamente por substancias ativas, chamadas de mediadores químicos da inflamação. Entre eles estão eicosanóides, citocinas, quimiocinas, histamina e serotonina.

Os venenos botrópicos, além de alterações sistêmicas, algumas vezes letais, induzem intensos efeitos inflamatórios locais, entre eles hemorragia e edema (Gutiérrez e Lomonte, 1989). Tais efeitos foram observados quando inoculado tanto o veneno total de *Bothrops moojeni* quanto a PLA₂ BmTX-I na região subplantar em patas de camundongos. O edema de pata induzido em camundongos ocorreu de forma dose e tempo-dependentes. Tanto na dose de veneno (10 μ g) como nas duas doses da PLA₂ BmTX-I (5 e 10 μ g) testadas, o edema atingiu índices máximos 0,5 horas após a injeção e estatisticamente insignificantes após 24 horas (Figura 20). Tais fenômenos foram também observados com os venenos de *Bothrops insularis* (Barbosa *et al.*, 2003) e *Bothrops jararacussu* (Ketelhut et al., 2003).

Estudos utilizando diferentes venenos ofídicos demonstram que o início do edema e o tempo necessário para que este alcance índices máximos variam consideravelmente (Selistre et al., 1990). Este fato poderia ser explicado por variações na composição e origem dos venenos, bem como por diferenças nas espécies de animais empregadas. Araújo et al (2000) descreveram que o veneno de *Bothrops lanceolatus* quando inoculado na região subplantar de camundongos produziam respostas edematizantes máximas somente 2 horas após a injeção, desaparecendo 24 horas.

Segundo Soares et al (2000) fosfolípases A₂ presentes em venenos ofídicos exercem grande variedade de efeitos farmacológicos, entre eles, uma importante atividade edematizante. Estas substâncias podem induzir edema por dois mecanismos distintos: a) através da liberação do ácido araquidônico em conseqüência da degradação enzimática da membrana fosfolipídica,

aumentando a biossíntese de eicosanóides e b) diretamente, afetando a microvasculatura, levando a exsudação do plasma.

Citocinas são produzidas por uma ampla variedade de células durante uma resposta inflamatória. Mionecrose poderia ser o impulso para desencadear a atividade pró- inflamatória e provavelmente incrementar os níveis de interleucina 6 (IL-6) para o veneno e para BmTX-I de *Bothrops moojeni*, da mesma forma como sugerido por Nuñez, et al (2004), para a miotoxina I PLA₂ K49 de *Bothrops atrox*. IL-6 é o principal sinal para o inicio da fase de resposta aguda nos hepatócitos (Goldsby et al., 2000), e elevações dessa citocina tem sido documentada clinicamente em envenenamentos por espécies botrópicas (Barraviera et al., 1995; Avila-Aguero et al., 2001).

Nossos resultados evidenciam a indução da resposta sistêmica de IL-6, causando um aumento plasmático dessa citocina 3h após a injeção e retornando gradativamente após 8 horas (Figuras 19A e 19B). Porém a liberação mais acentuada foi verificada com a injeção da PLA₂ BmTX-I na concentração de 20 µg o que mostra a importância das PLA₂s na ação inflamatória do veneno.

Fosfolipases A₂ purificadas a partir de veneno de serpentes podem ser largamente utilizadas como modelos biológicos para compreensão de mecanismos de injuria tecidual além de toda a cascata inflamatória e imunológica.

Nossos resultados mostraram a presença de uma fosfolípase A_2 com atividade catalítica, ainda não descrita na literatura para este veneno, indicativo da presença do aminoácido aspartato na posição 49 da cadeia polipeptídica, com importante participação na estrutura tridimensional responsável pela atividade de hidrólise dos fosfolipídios, contribuindo para a compreensão e importância das características estruturais em tornar uma proteína biologicamente funcional.

6. Conclusões Gerais

• Foi isolado uma isoforma de PLA₂ Asp49, denominada BmTX-I, utilizando um simples e rápido procedimento, baseado em sistema de HPLC de fase reversa. A massa molecular da isoforma BmTX-I foi determinada como 14.238,71.

• A analise de composição de aminoácidos mostrou que se trata de uma proteína de caráter básico pela alta presença de aminoácidos básicos (Lys, His e Arg). A determinação da região N-terminal da BmTX-I mostrou um alto grau de homologia com outras PLA₂s de veneno como a BthTx-II – bothropstoxin II do veneno de *Bothrops jararacussu*.

• A BmTX-I apresentou atividade enzimática máxima entre 35 e 45 °C e pH 8,0. Na presença do substrato sintético, a PLA₂ mostrou um comportamento alostérico especialmente com baixas concentrações do substrato. BmTX-I mostrou ser uma PLA₂ Ca²⁺ dependente, e sua atividade foi menor na presença de outros cátions. A inibição da atividade catalítica da BmTX-I pela ligação com as crotapotinas (F3 e F4) do veneno de *Crotalus durrissus collilineatus* poderia estar ocorrendo de uma maneira similar àquele visto no complexo crotoxina (PLA₂ + crotapotina).

• Tanto o veneno total de *Bothrops moojeni* quanto a fração BmTX-I apresentaram uma ação neurotóxica *in vitro*, concentração dependente, frente a preparação biventer cervicis de pintainho, porém com menos potência quando comparado a venenos crotálicos. Além disso, foi mostrado que tanto o veneno como a PLA₂ possuem uma ação preferencial em sítios présinápticos demonstrada em baixas concentrações, pois após o bloqueio neuromuscular total as preparações continuaram respondendo com contratura à adição da acetilcolina e potássio. Exceto na mais alta concentração de veneno (100 μg/ml) isto não foi observado.

• O aumento da concentração de creatina quinase (CK) no plasma de camundongos após a injeção intramuscular do veneno e da fração BmTX-I mostra o efeito miotóxico *in vivo*, além de demonstrar a capacidade das PLA₂s presentes nos venenos de serpentes em danificar o tecido muscular.

• As reações inflamatórias geradas pelo veneno e pela BmTX-I foram bastante potentes. No caso da formação de edema de pata a porcentagem de edema atingiu níveis bastante expressivos tanto com injeção de veneno quanto de PLA₂. Já a liberação da citocina IL-6 foi mais acentuada na concentração de 20 µg da fração BmTX-I. Mostrando a importância das PLA₂s nos efeitos inflamatórios causados pelos venenos de serpentes.

47

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/ tese de mestrado/doutorado intitulada Caracterização Físico-Química e Biológica de uma Fosfolipase A₂ Isolada do Veneno de *Bothrops moojeni*:

() não se enquadra no Artigo 1°, § 3° da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº_____), intitulado

(x) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1040-1). β

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº_____).

Aluno Aluno

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

quardo anuda H Profa. Dra. ANA MARIA A. GUARALDO Nome:

Presidente Função: Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/IB - UNICAMP

7. Referências Bibliográficas

- Araújo, F.A.A.; Santalúcia, M.; Cabral, R.F. (2003). Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: Cardoso, J.L.C.; França, F.O.S; Wen, F.H.; Málaque, C.M.S.; Haddad Júnior, V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clinica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, p. 6-12.
- Araújo, M.S., Oliva, M.L., Souza-Pinto, J.C., Batista, I.F., Silveira, V.F., Auerswald, E.A., Mentele, R., Eckerskorn, C., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A. (2000). Biochim Biophys Acta. 1477, 64-74.
- Arni, R. K. e Ward, R. J. (1996). Phospholipase A₂ a structural review. Toxicon 34, 827-841.
- Avila-Aguero, M.L., Parýs, M.M., Hu, S., Peterson, P.K., Gutie'rrez, J.M., Lomonte, B., Faingezicht, I. (2001). Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. Ped. Emerg. Care 17, 425–429.
- Azevedo-Marques, M.M., Cupo, P., Coimbra, T.M., Hering, S. E., Rossi, M. A., and Laure, C. J. (1982). Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by south american rattlesnake (Crotalus durissus terrificus) envenomation in Brazil. Toxicon 23 631-636.
- Barbosa, A.M., do Amaral, R.O., Teixeira, C.F., Hyslop, S., Cogo, J.C. (2003). Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by Bothrops insularis (jararaca ilhoa) snake venom. Toxicon. 42, 515-523.
- Barraviera, B.& Pereira, P.C.M. (1994). Acidentes por serpentes do gênero Bothrops. In: Barraviera, B. Venenos animais. 1º edição. EPUC: Rio de Janeiro, Brasil.
- Barraviera, B., Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, L.A., Meira, D.A. (1995). Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by Bothrops and Crotalus snakes in Brazil.
- Beghini, D. G., Toyama, M. H., Hyslop, S., Sodek, L. C., Novello, J. C., Marangoni, S. (2000). Enzymatic characterization of a novel phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (maracambóia) venom. J. Protein Chem. 19, 679-684.
- Bonfim, V. L., Toyama, M. H., Novello, J. C., Hyslop, S. Oliveira, C. R. B., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S. (2001). Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. J. Protein Chem. 20, 239-245.
- Bonta, I.L., Vargaftig, B.B., Bohm, G.M. (1979). Handbook of experimental pharmacology. In: Lee, C.Y., (Ed.), Snake Venoms, vol. 52., pp. 629–683. induces a synovitis-like inflammation in the rat air pouch. J. Rheumatol. 21, 824–829.
- Brain, S.D. and Whittle, B.J.E., 1977. Action of phospholipase A2 on mast cell histamine release and paw oedema in rat. Br. J. Pharmacol. 59, 440.
- Breithaupt, H. (1976) Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A₂ and the crotoxin complex. Toxicon 14, 221-233.

- Cho,W. e Kezdy, F. J. (1991). Chromogenic substrates and assay of phospholipases A₂. Meth. Enzymol. 197, 75-79.
- Cintra, A.C.O., Marangoni, S., Oliveira, B., And Giglio, J.R. (1993). Bothropstoxin-I: aminoacid sequence and Function. J. Protein Chem. 12, 57-64.
- Cogo JC, Prado-Franceschi J, Cruz-Hofling MA, Corrado AP, Rodrigues-Simioni L. (1993). Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. Toxicon; 1237-1247.
- Costa PD, Toyama MH, Marangoni S, Rodrigues-Simioni L, da Cruz-Hofling MA. (1999). Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. Toxicon; 37, 1143-53.
- Deems, A.S., Dennis, E.A. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization, Biochim. Biophys. Acta 1488 1–19.
- Dennis, E. A. (2000). Phospholipase A₂ in Eicosanoid Generation. Am J. Respir. Crit. Care Med. 161, 32-35.
- Dennis, E.A. (1994). Diversity of Groups Types, Regulation and Function of Phospholipases A2. J. Biol. Chem. 269: 13057-13060. Disintegrins: interactions with cells. Braz. J. Med. Biol. Res. 31, 853-862.
- FUNASA (Fundação Nacional de Saúde), 2002. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. Brasília: FUNASA, Ministério da Saúde.
- Ginsborg, B.L. and Warriner, J. (1960). Spontaneous activity in muscle fibres of the chick. Brit. J. Physiol. 150, 707-717.
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A. (2000). Kuby Immunology, W.H. Freeman, New York.
- Gutierrez JM, Lomonte B. (1995). Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. Toxicon 33, 1405-1424.
- Gutierrez JM, Ownby CL (2003). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. Toxicon 42, 915-931.
- Gutierrez, J.M. and Lomonte, B. (1989). Local tissue damage induced by Bothrops snake venoms. A review. Mem Inst Butatan,51, 211-223.
- Gutierrez, J.M. e Lomonte, B. (2003). Cap. 32 Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en America Latina - ANIMAIS PEÇONHENTOS NO BRASIL: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes Ed. Sarvier, São Paulo pp 310-323.

- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. (1997). Phospholipase A₂ myotoxins from Bothrops snake venoms.
 In: Kini, R.M., (Ed.), Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism, Wiley, Chichester, England, pp. 321–352.
- Harvey, A.L.; Bradley, K.N.; Cochran, S.A.; Rowan, E.G.; Pratt, J.A.; Quillfeldt, J.A.; Jerusalinsky, D.A. (1998). What can toxins tell us for drug discovery? Toxicon 36, 1635-1640
- Heinrikson, R. L. & Meredith, S. C. (1984). Amino acid analysis by reverse phase highperfomance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylthiocyanate. Anal. Biochem. 13, 65-72.
- Hodgson Wayne C. and Wickramaratna Janith (2002). *In vitro* neuromuscular activity of snake venoms Clin. and Exper. Pharmacol. Physiol. 29, 807-814.
- Holzer, M. e Mackessy, S. P. (1996). An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. Toxicon 34, 1149-1155.
- Kamiguti, A.S., Zuze, M And Theakston, R.G. D. (1998). Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. Braz. J. Med. Biol. Res. 31, 853-862.
- Karlsson, E. (1979). Chemistry of protein toxic in snake venom. In Lee, C.Y. (Ed): Handbook of Experimental Pharmacology. Springer-Velag Berlin Heidelberg. pp 159-212.
- Ketelhut, D.F., de Mello, M.H., Veronese, E.L., Esmeraldino, L.E., Murakami, M.T., Arni, R.K., Giglio, J.R., Cintra, A.C., Sampaio, S.V. (2003). Biochimie. 85, 983-91.
- Kini, R. M. (1997a). Phospholipase A2 a complex multifunctional protein puzzle. In: Kini, R.M., (Ed.), Enzymes: Structure, Function and Mechanism, Wiley, Chichester, England, pp.1–28.
- Kini, R. M. (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes.Toxicon 42, 827–840.
- Kini, R.M. (2005). Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms.Toxicon 45, 1147-61.
- Kini, R.M. (2006). Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. Biochem J. 397, 377-387. Review.
- Kini, R.M., Evans, H.J. (1989a). A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. Toxicon 27, 613–635.
- Kini, R.M., Evans, H.J. (1989b). A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. Int. J. Peptide Protein Res. 34, 277–286.

- Kini, R.M., Evans, H.J. (1989c). Role of cationic amino acid residues in cytolytic activity. Modifications of lysine residues in the cardiotoxin from Naja nigricollis venom and correlation between cytolytic and antiplatelet activities. Biochemistry 28, 9209–9215.
- Landucci, E. C. T., Toyama, M. H., Marangoni, S., Benedito, O., Giuseppe, C., Antunes, E., de Nucci, G. (2000). Effect of crotapotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A₂. Toxicon 38, 199-208.
- Lewis, R. L. e Gutmann, L. (2004). Snake venoms and the neuromuscular junction. Sem. Neurol. 24, 175-179.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón, L. (2003). An overview of Lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. Toxicon 42, 885–901.
- Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Furtado, M. F., Otero, R., Rosso, J. P., Vargas, O., Carmona, E., and Rovira, M. E. (1990). *Toxicon* 28, 1137–1146.
- Markland, F (2005). Snake venoms and the hemostatic system. Toxicon 36, 1749-1800.
- Matsui, T; Fujimura, Y.; Titani, K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. Biochem, Biophy. Acta, 1477, 146-156.
- Monterrey, F. (2001). Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias, UCV, Caracas, Venezuela.
- Núñez, V., Arce, V., Gutiérrez, J. M. Lomonte, B. (2004). Structural and functional characterization of myotoxin I, a lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. Toxicon 44, 91-101.
- Ownby, C.L., Selistre-de-Araujo, H.S., White, S.P., Fletcher, J.E. (1999). Lysine 49 phospholipase A2 proteins. Toxicon 37, 411–445.
- Pereira, M.E., Novello, J.C., Cintra, A.C.O., Giglio, J.R., Landucci, E.T., Oliveira, B. And Marangoni, S. (1998). The amino acid sequence of Bothropstoxin-II, na Asp49 myotoxin from Bothrops jararacussu (jarracuçu) venom with low phospholipase A₂ activity. J. Prot. Chem. 17, 381-386.
- Ponce-Soto LA, Toyama MH, Hyslop S, Novello JC, Marangoni S. (2002). Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. J Protein Chem. 21, 131-136.
- Rigden DJ, Hwa LW, Marangoni S, Toyama MH, Polikarpov I (2003). The structure of the D49 phospholipase A2 piratoxin III from Bothrops pirajai reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: póssiblerelationship to cooperative substrate binding. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 59, 255-262.
- Rodrigues-Simioni L, Borgese N, Ceccarelli B. (1983). The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. Neuroscience. 10, 475 489.

- Rodrigues-Simioni L, Rodrigues V, Fontes MR, Lomonte B, Gutiérrez JM, Giglio JR. (2000). Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi* pauloensis venom. Arch Biochem Biophys 15, 378, 201-209
- Rodrigues-Simioni, L., Zamunér, S. R., Cogo, J. C., Borja-Oliveira, C. R., Prado-Franceschi, J., Cruz-Höfling, M. A. e Corrado, A. P. (2004). Pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). Toxicon 43, 633-638.
- Rodriguez-Acosta, Aléxis(2001) http://caibo.ucv.ve/vitaenueve/articulos/medicinatropical/archivosPDF
- Rosenberg, P. (1986). The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases. In: Harris, J.B., (Ed.), Natural Toxins, Oxford University Press, Oxford, pp. 129–174.
- Rosenfeld, G. (1971). Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: (Bucherl, W. and Buckley, E.E., ed). Venomous Animals and their Venoms, New York, Academic Press, 2, 345-384.
- Rübsamen, K., Breithaupt, H., Habermann, E. (1971). Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 270, 274-288.
- Schagger, H. A.; Von Jagow, G. (1987). Comassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. Anal. Biochem. 166, 368-379.
- Scott, D. L. e Sigler, P. B. (1997). Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipase A₂, in: C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, F. M. Richards, D. S. Eisenberg (Eds.), Lipoproteins, Apolipoproteins and Lipases, vol. 45, Advances in protein chemistry, Academic Press, California, pp. 53-80.
- Selistre, H.S., Queiroz, L.S., Cunha, O.A.B., De Souza, G.E.P., Giglio, J.R. (1990). Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from Bothrops
- Smith, W.L., Deitt, D.L., Garavito, R.M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. Annu. Rev. Biochem. 69, 145–182.
- Soares AM, Guerra-S inverted question marka R, Borja-Oliveira CR, Rodrigues VM, Rodrigues-Simioni L, Rodrigues V, Fontes MR, Lomonte B, Gutiérrez JM, Giglio JR. 2000. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi* pauloensis venom. Arch Biochem Biophys 15, 201-209.
- Soares AM, Oshima-Franco Y, Vieira CA, Leite GB, Fletcher JE, Jiang MS, Cintra AC, Giglio JR, Rodrigues-Simioni L. (2004). Mn²⁺ ions reduce the enzymatic and pharmacological

activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. Int J Biochem Cell Biol. 34, 668-677.

- Soares AM, Rodrigues VM, Borges MH, Andriao-Escarso SH, Cunha OA, Homsi-Brandeburgo MI, Giglio JR. (1997). Inhibition of proteases, myotoxins and phospholipases A₂ from Bothrops venoms by the heteromeric protein complex of *Didelphis albiventris* opossum serum. Biochem Mol Biol Int. 43, 1091-1099.
- Soares, A.M., Anzaloni-Pedrosa, L.H., Fontes, M.R.M., da Silva R. J., Giglio J. R. (1998).
- Stabeli, R,G., Sant'Ana, C.D., Ribeiro, P.H., Costa, T.R., Ticli, F.K., Pires, M.G., Nomizo, A., Albuquerque, S., Malta-Neto, N.R., Marins, M., Sampaio, S.V., Soares, A.M. (2007). Int J Biol Macromol. 41, 132-140.
- Teixeira, C.F.P., Landucci, E.C.T., Antunes, Chacur, E., Cury, M. Y. (2003). Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. Toxicon. 42, 947-962
- Toyama, M. H.; Carneiro, E. M.; Marangoni, S.; Barbosa, R. L.; Corso, G. and Bochero, A. C. (2000). Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from Crotalus durissus terrificus (South American Rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatics islets, Biochim. Biophy. Acta. 1474, 56-60.
- Tu, a. T. (1997). Venoms, Chemistry and molecular biology. New York-London-Sydney-Toronto. John Willey.
- Verheij, H. M., Egmond, M. R., de Hass, G. H. (1981). Chemical Modification of the α-amino group in snake venom phospholipase A₂. A comparison of the interaction of pancreatic and venom phospholipases with lipid-water interfaces. Biochemistry 20, 94-99.
- Winstead, M.V., Balsinde, J., Dennis, E.A. (2000). Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. Biochim Biophys Acta. 1488, 28-39.