

*Salomón Huancahuire Vega*

**“Modificações Químicas e Caracterização Farmacológica das  
Miotoxinas PhTX-I e PhTX-II Isoladas do Veneno de *Porthidium  
hyoprora*”**

**CAMPINAS  
2012**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

*Salomón Huancahuire Vega*

**“Modificações Químicas e Caracterização Farmacológica das Miotoxinas  
PhTX-I e PhTX-II Isoladas do Veneno de *Porthidium hyoprora*”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Salomón Huancahuire Vega*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

*Sergio Marangoni*

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

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

CAMPINAS  
2012

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

V522m	<p>Vega, Salomón Huancahuire, 1981- Modificações químicas e caracterização farmacológica das miotoxinas PhTX-I e PhTX-II isoladas do veneno de <i>Porthidium hyoprora</i> / Salomón Huancahuire Vega. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Sergio Marangoni. Coorientador: Luís Alberto Ponce Soto. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Porthidium hyoprora</i>. 2. Miotoxinas. 3. Fosfolipases A2. 3. Proteínas - Modificações químicas. 4. Miotoxina PhTX-I. 5. Miotoxina PhTX-II. I. Marangoni, Sergio, 1951- II. Ponce-Soto, Luís Alberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Chemical modifications and pharmacological characterization of PhTX-I and PhTX-II myotoxins isolated from *Porthidium hyoprora*

**Palavras-chave em Inglês:**

*Porthidium hyoprora*

Myotoxins

Phospholipases A2

Proteins - Chemical modifications

Myotoxin PhTX-I

Myotoxin PhTX-II

**Área de concentração:** Bioquímica

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

**Banca examinadora:**

Sergio Marangoni [Orientador]

Marcio Alberto Torsoni

Walter Luís Garrido Cavalcante

Fernanda Ramos Gadelha

Vera Lúcia Bonfim Tiburcio

**Data da defesa:** 07-11-2012

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

Campinas, 07 de novembro de 2012

**BANCA EXAMINADORA**

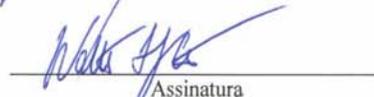
Prof. Dr. Sergio Marangoni (Orientador)

  
Assinatura

Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni

  
Assinatura

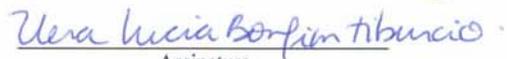
Prof. Dr. Walter Luís Garrido Cavalcante

  
Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

  
Assinatura

Profa. Dra. Vera Lúcia Bonfim Tiburcio

  
Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Carmen Verissima Ferreira Halder

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Thalita Rocha

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## **Dedicatória**

Dedico esta tese, com satisfação e alegria:

A minha família....

*A mis queridos padres Eduardo y Elena, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. La finalización de este trabajo representa la conquista de una grande etapa de mi vida, donde ustedes figuran como actores principales.*

*A mis queridas hermanas Carmen, Liz, Ruth y Helencita, cuanto cariño, amor y nostalgias. Mi vida cerca de ustedes es más feliz.*

## **Agradecimentos**

Meus agradecimentos ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Marangoni, pela oportunidade e recepção em seu laboratório, pela orientação e principalmente pelo bom convívio nestes quatro anos de trabalho. Com ele tive a oportunidade de enriquecer meu conhecimento, com suas argumentações científicas e sugestões nos meus projetos, relatórios, teses, entre outros.

Agradeço ao meu coorientador Prof. Dr. Luís Alberto Ponce Soto, pela amizade, confiança e incentivo durante todo esse período, pelas sugestões e discussões do trabalho. Sou grato pelos ensinamentos de vida e científicos transmitidos.

A Prof. Dra. Adriana Franco Paes Leme do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), pela colaboração com as análises de espectrometria de massas, fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Carlos H. I. Ramos e Daniel Corrêa (IQ-Unicamp), por ter cedido espaço no laboratório sob sua responsabilidade, assim colaborando com a realização dos experimentos de dicroísmo circular.

Ao Prof. Dr. Marcelo Lancellotti e a Luciana M. Hollanda, do Laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC IB-Unicamp), pela colaboração nos ensaios de atividade citotóxica.

Aos professores da banca e pré-banca: Prof. Dr. Walter Cavalcante, Profa. Dra. Carmen Ferreira, Prof. Dr. Marcio Torsoni, Profa. Dra. Fernanda Gadelha e Profa. Dra. Vera Bonfim, por terem aceitado a participar da avaliação e por contribuírem com a melhora deste trabalho.

A todos os professores que ensinam no Departamento de Bioquímica, socializando o conhecimento, a minha gratidão.

Ao Paulo Baldasso (Paulinho), um agradecimento especial, pela amizade e ajuda fundamental nos experimentos realizados durante todo o projeto.

Em especial aos colegas do laboratório: Magaly, Miriam, Desire, Daniela, Víctor, Caio, Frank, Augusto, Frey e aos mais novos Leticia, Rafael e Miguel pela alegre convivência e sugestões no desenvolvimento deste trabalho. A vocês muito obrigado!

A FAPESP pela concessão de bolsa de estudo que possibilitou a realização desta tese.

Senhor Deus, agora meu agradecimento a Ti. Não por último, porque sei que És o primeiro, mas agora, por ser especial. Tu és maravilhoso e Deus Forte, paciente e benigno. Tens sido meu refúgio, fortaleza e socorro bem presente na angústia. Tens me dado paz, mesmo em momentos muito difíceis... E eu Te agradeço por isso.

Como cantou o salmista – “Quando contemplo as maravilhas da Tua criação, que é o homem para que dele Te lembres? E o filho do homem, para que o visites? Fizeste-o pouco menor que os anjos...” Por isso também eu sou grato. Sou grato, ainda, porque me concedestes tantos amigos aqui.

## Índice

	Pág
Lista de abreviações.....	x
Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas.....	xiii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Veneno de serpentes.....	01
1.2 O veneno botrópico.....	02
1.2.1 Atividade hemorrágica.....	02
1.2.2 Atividade coagulante e agregação plaquetária.....	03
1.2.3 Atividade inflamatória.....	03
1.2.4 Atividade miotóxica.....	03
1.2.5 Atividade paralisante neuromuscular.....	04
1.3 Fosfolipases A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ).....	05
1.4 Estrutura e função das PLA <sub>2</sub> .....	06
1.5 Ação biológica das PLA <sub>2</sub> .....	10
1.6 Miotoxinas PLA <sub>2</sub> .....	11
1.7 Neurotoxinas PLA <sub>2</sub> .....	13
1.8 Modificações químicas das PLA <sub>2</sub> .....	13
1.9 Ferramentas moleculares.....	14
1.10 <i>Porthidium hyoprora</i> .....	15
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Veneno e reagentes.....	17
3.2 Animais.....	17
3.3 Purificação das PLA <sub>2</sub> em HPLC de fase reversa.....	17
3.4 Eletroforese em SDS-PAGE.....	17
3.5 Atividade fosfolipásica A <sub>2</sub> .....	18
3.6 Estudos cinéticos.....	18
3.6.1 Efeito do pH na atividade PLA <sub>2</sub> .....	18
3.6.2 Efeito da temperatura na atividade PLA <sub>2</sub> .....	19
3.6.3 Efeito da concentração do substrato na atividade PLA <sub>2</sub> .....	19
3.6.4 Efeito de íons divalentes na atividade PLA <sub>2</sub> .....	19
3.6.5 Estudos de inibição enzimática.....	19
3.7 Análise de aminoácidos.....	19
3.8 Determinação da massa molecular por espectrometria de massas Maldi-tof.....	19
3.9 Determinação da estrutura primária.....	20

3.9.1	Redução e alquilação.....	20
3.9.2	Hidrólise enzimática.....	20
3.9.3	Espectrometria de massas em tandem.....	20
3.9.4	Sequenciamento “de novo” dos peptídeos trípticos.....	21
3.10	Modificações químicas da PLA <sub>2</sub> PhTX-I.....	21
3.10.1	Alquilação de histina com 2,4'-Dibromoacetophenone (BPB).....	21
3.10.2	Acetilação de lisina com anidro acético (AA).....	21
3.10.3	Sulfonilação de tirosina com 4-Nitrobenzenesulfonil fluoride (NBSF).....	22
3.10.4	Sulfonilação de triptofano com 2-Nitrobenzenesulfonil cloride (NPSC).....	22
3.11	Determinação da massa molecular das proteínas modificadas por espectrometria de massas Electrospray (ESI).....	22
3.12	Espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD).....	23
3.13	Espectros de dicroísmo circular.....	23
3.14	Determinação das atividades farmacológicas.....	24
3.14.1	Medida da atividade paralisante neuromuscular em músculo <i>biventer cervicis</i> .....	24
3.14.2	Determinação dos níveis de CK plasmáticos em camundongos.....	24
3.14.3	Determinação da atividade edematogênica (edema de pata).....	25
3.14.4	Quantificação de Interleucina 6 (IL-6).....	25
3.14.5	Atividade citotóxica sobre cultura celular de mioblastos e miotubos.....	26
3.14.6	Atividade citotóxica sobre cultura celular NG97 e NCIH-3T3.....	27
3.15	Análise estatística.....	27
4.	RESULTADOS.....	28
4.1	Purificação e caracterização bioquímica das PLA <sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.....	28
4.1.1	Purificação das frações PhTX-I e PhTX-II a partir do veneno total de <i>P. hyoprora</i> .....	28
4.1.2	Determinação do grau de pureza, recuperação e atividade específica de PhTX-I e II.....	29
4.1.3	Análise de composição de aminoácidos das PLA <sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.....	30
4.1.4	Determinação da massa molecular por espectrometria de massas Maldi-tof.....	31
4.1.5	Caracterização da estrutura primária da PLA <sub>2</sub> PhTX-I.....	33
4.1.6	Caracterização da estrutura primária da PLA <sub>2</sub> PhTX-II.....	35
4.1.7	Dicroísmo circular das PLA <sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.....	37
4.1.8	Estudos da cinética enzimática das PLA <sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.....	38
4.2	Caracterização farmacológica das PLA <sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.....	40
4.2.1	Determinação da atividade paralisante neuromuscular <i>ex vivo</i> do VT, PhTX-I e II.....	40
4.2.2	Atividade miotóxica local <i>in vivo</i> do VT e das PLA <sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.....	42
4.2.3	Atividade miotóxica sistêmica <i>in vivo</i> do VT e das PLA <sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.....	42
4.2.4	Determinação da atividade edematogênica do VT e das PLA <sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.....	43
4.2.5	Determinação dos níveis de IL-6 após injeção intramuscular do VT e PhTX-I.....	44
4.2.6	Determinação do efeito citotóxico do VT e PhTX-I sobre mioblastos e miotubos.....	44
4.2.7	Atividade citotóxica das PLA <sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II sobre células NIH-3T3 e NG97.....	45
4.3	Modificações químicas na PLA <sub>2</sub> PhTX-I.....	46

4.3.1	Eletroforese em SDS-PAGE da PLA <sub>2</sub> PhTX-I nativa e das modificadas.....	46
4.3.2	Determinação da massa intacta das proteínas modificadas por MS ESI.....	46
4.3.3	Análise de composição de aminoácidos das formas modificadas.....	47
4.3.4	Dicroísmo circular.....	48
4.3.5	Determinação da atividade PLA <sub>2</sub> de PhTX-I e das formas modificadas.....	49
4.3.6	Determinação da atividade paralisante neuromuscular <i>ex vivo</i> .....	50
4.3.7	Atividade miotóxica local <i>in vivo</i> .....	52
4.3.8	Determinação da atividade edematogênica.....	53
4.3.9	Determinação da atividade citotóxica.....	54
5.	DISCUSSÃO.....	55
5.1	Purificação e caracterização bioquímica das PLA <sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.....	55
5.2	Caracterização farmacológica das PLA <sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.....	58
5.3	Modificações químicas na miotoxina PhTX-I e seus efeitos sobre suas atividades enzimática, farmacológicas e estruturais.....	66
6.	CONCLUSÕES.....	74
7.	BIBLIOGRAFIA.....	76

### Lista de Abreviações

TFA	Ácido trifluoracético
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
HPLC-FR	Cromatografia de alta definição de fase reversa
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de poliacrilamida - Dodecil Sulfato de Sódio
BPB	2,4'-Dibromoacetophenone
AA	Anidro acético
NBSF	4-Nitrobenzenesulfonil fluoride
NPSC	2-Nitrobenzenesulfonil cloride
ESI	Espectrometria de massas Electrospray
Maldi-tof	Matriz Assistida Laser Desorção Ionização – Tempo de Vôo
CD	Dicroísmo circular
CK	Creatino kinase
IL-6	Interleucina 6
NG97	Linhagem celular de fibroblastos
NCIH-3T3	Linhagem celular derivada de astrocitoma humano grado III
ACh	Acetilcolina
C2C12	Linhagem celular de mioblastos e miotubos murinos
PhTX-I	Toxina PLA <sub>2</sub> I de <i>P. hyoprora</i>
PhTX-II	Toxina PLA <sub>2</sub> II de <i>P. hyoprora</i>
ESI-QTOF-MS/MS	Espectrometria de massa em tandem quadrupole-tempo de vôo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
LDH	Lactato Desidrogenase
PBS	Tampão Fosfato Salina
DTT	Ditiotreitól
YM-3	Membrana Amicom com poros de 3000 Daltons
μ-Bondapak C18	Coluna de HPLC com n-octadecyl como base da fase estacionária
NOAB	Substrato cromogênico ácido 4-nitro-(3-octanoiloxi) benzóico

## Lista de Figuras

	Pág
<b>Figura 1</b> Hipótese sobre o desenvolvimento dos efeitos locais induzidos por venenos botrópicos.....	5
<b>Figura 2.</b> Representação em fita de uma PLA <sub>2</sub> .....	7
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática da alça de ligação do íon cálcio.....	8
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do mecanismo catalítico da PLA <sub>2</sub> .....	9
<b>Figura 5</b> Hipótese sobre o mecanismo de ação das PLA <sub>2</sub> miotóxicas do veneno de <i>Bothrops</i> sp.....	12
<b>Figura 6.</b> Perfil cromatográfico do veneno total de <i>P. hyoprora</i> em HPLC de fase reversa.....	28
<b>Figura 7.</b> Re-cromatografia das frações PhTX-I e PhTX-II em HPLC de fase reversa.....	29
<b>Figura 8.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) SDS-PAGE.....	30
<b>Figura 9.</b> Determinação da massa molecular das PLA <sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II por MS Maldi-tof.....	32
<b>Figura 10.</b> Espectro ESI-QTOF-MS/MS do peptídeo tríptico de 1312.38 Da de PhTX-I .....	34
<b>Figura 11.</b> Alinhamento da sequencia de aminoácidos deduzida da PhTX-I com outras PLA <sub>2</sub> .....	35
<b>Figura 12.</b> . Espectro ESI-QTOF-MS/MS mostrando as séries de íons y de PhTX-II.....	36
<b>Figura 13.</b> Alinhamento da sequencia de aminoácidos deduzida da PhTX-II com outras PLA <sub>2</sub> .....	37
<b>Figura 14.</b> Espectros de CD no UV-distante das PLA <sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.....	38
<b>Figura 15.</b> Atividade enzimática do veneno total de <i>P. hyoprora</i> , e das PLA <sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.....	39
<b>Figura 16.</b> Representação gráfica do bloqueio neuromuscular do VT, PhTX-I e PhTX-II.....	40
<b>Figura 17.</b> Registros miográficos da resposta muscular em presença do VT, PhTX-I e PhTX-II.....	41
<b>Figura 18.</b> Porcentagem de bloqueio da contração em resposta à ACh e K do VT, PhTX-I e PhTX-II	41
<b>Figura 19.</b> Representação gráfica da atividade miotóxica local do VT, PhTX-I e PhTX-II.....	42
<b>Figura 20.</b> Representação gráfica da atividade miotóxica sistêmica do VT, PhTX-I e PhTX-II.....	43
<b>Figura 21.</b> Atividade edematogênica do VT, PhTX-I e PhTX-II.....	43
<b>Figura 22.</b> Níveis de Interleucina (IL-6) plasmática induzida por VT e PhTX-I.....	44
<b>Figura 23.</b> Atividade citotóxica do VT e da PhTX-I sobre cultura de mioblastos e miotubos.....	45
<b>Figura 24.</b> Atividade citotóxica de PhTX-I e PhTX-II sobre células NCIH-3T3 e NG97.....	45
<b>Figura 25.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%). SDS-PAGE PLA <sub>2</sub> modificadas.....	46
<b>Figura 26.</b> Espectros de massa ESI da PhTX-I modificada com BPB, AA, NPSC e NBSF.....	47
<b>Figura 27.</b> Espectros de CD no UV-distante. PhTX-I nativa e as formas modificadas.....	49
<b>Figura 28.</b> Atividade PLA <sub>2</sub> da PhTX-I nativa e das formas modificadas .....	50

<b>Figura 29.</b> Representação gráfica do bloqueio neuromuscular das PhTX-I modificadas.....	50
<b>Figura 30.</b> Registros miográficos da resposta muscular em presença de PhTX-I modificadas.....	51
<b>Figura 31.</b> Representação gráfica da atividade miotóxica local da PhTX-I nativa e modificadas .....	52
<b>Figura 32</b> Atividade edematogênica da PLA <sub>2</sub> PhTX-I e das formas modificadas.....	53
<b>Figura 33.</b> Atividade citotóxica da PhTX-I nativa e modificadas sobre cultura NCIH-3T3 e NG97.....	54

**Lista de Tabelas**

	Pág
<b>Tabela 1.</b> Fosfolipases A <sub>2</sub> secretórias (sPLA <sub>2</sub> ).....	6
<b>Tabela 2.</b> Estratégias para modificações químicas de aminoácidos em PLA <sub>2</sub> .....	14
<b>Tabela 3</b> Tabela de recuperação e cálculo de atividade específica das frações PhTX-I e PhTX-II.....	30
<b>Tabela 4.</b> Composição de aminoácidos das PLA <sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.....	31
<b>Tabela 5.</b> Massas e sequências de aminoácidos ESI-MS/MS dos peptídeos trípticos de PhTX-I.....	33
<b>Tabela 6.</b> Massas e sequências de aminoácidos ESI-MS/MS dos peptídeos trípticos de PhTX-II.....	36
<b>Tabela 7.</b> Composição de aminoácidos da PLA <sub>2</sub> PhTX-I nativa e modificadas.....	48

## Resumo

No presente trabalho, a partir do veneno de *Porthidium hyoprora*, foram purificadas duas fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) miotóxicas, denominadas PhTX-I e PhTX-II, determinadas suas seqüências primárias e caracterizadas bioquímica e farmacologicamente. Ambas as proteínas foram purificadas em uma única etapa cromatográfica (HPLC-FR), sendo obtidas homogêneas e com alto grau de pureza, confirmado por SDS-PAGE, análise de aminoácidos e espectrometria de massas. PhTX-I e PhTX-II estão constituídas de uma única cadeia polipeptídica e possuem massas moleculares de 14.249 e 14.149 Da, respectivamente. A seqüência de aminoácidos foi determinada via espectrometria de massas ESI-MS/MS, pertencendo à família das PLA<sub>2</sub> D49. A estrutura secundária predominante destas proteínas está constituída de  $\alpha$ -hélices. PhTX-I e PhTX-II induziram atividade paralisante neuromuscular *ex vivo* na preparação de *biventer cervicis* de pintainho e esta atividade foi similar ao efeito de outras PLA<sub>2</sub> de veneno botrópico. *In vivo*, tanto PhTX-I quanto PhTX-II, induziram elevada miotoxicidade local e atividade edematogênica. Adicionalmente, PhTX-I induz liberação de IL-6 após injeção intramuscular em camundongos. *In vitro*, PhTX-I e PhTX-II foram citotóxicas de maneira dose-dependente para as linhagem celulares de fibroblastos NIH-3T3 e NG97 derivada de astrocitoma humano grau III. Adicionalmente PhTX-I foi citotóxica sobre cultura celular de miotubos C2C12, entretanto teve pouco efeito citolítico sobre mioblastos de músculo esquelético. Foram feitas modificações químicas em resíduos de aminoácidos específicos da PhTX-I e avaliadas suas atividades farmacológicas após as modificações. Foram modificados um resíduo de His e Trp, quatro de Tyr e sete de Lys. A análise destas proteínas por dicroísmo circular demonstrou que a estrutura secundária das proteínas modificadas não foi alterada significativamente. Avaliação das atividades biológicas indicam um papel crítico desempenhado pelos aminoácidos Lys e Tyr na miotoxicidade, efeito paralisante neuromuscular e principalmente na citotoxicidade induzida por PhTX-I. A atividade catalítica da PhTX-I é relevante para os efeitos edematogênico, paralisante neuromuscular e miotóxico, mas não para sua atividade citotóxica, pois este efeito foi completamente independente da atividade catalítica de PhTX-I, evidenciando a existência de regiões moleculares, diferentes a do sítio catalítico, as quais podem ser responsáveis por pelo menos algumas das propriedades farmacológicas da PhTX-I. Podemos concluir, que apesar de ser demonstrada uma dissociação parcial, tanto o sítio catalítico como os sítios farmacológicos hipotéticos são relevantes para o perfil farmacológico de PhTX-I.

### Abstract

In this work, were purified two myotoxics phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), PhTX-I and PhTX-II, from *P. hyoprora* snake venom, determined their primary sequences and characterized their pharmacological and biochemical activities. These proteins were purified in a single chromatographic step (FR-HPLC) and obtained with homogeneous and high purity, which was confirmed by SDS-PAGE, amino acid analysis and mass spectrometry. PhTX-I and PhTX-II are constituted of a single polipeptide chain and have molecular mass of 14.249 and 14.149 Da, respectively. The amino acid sequence was determined by ESI-MS/MS mass spectrometry; belong to PLA<sub>2</sub> D49 family. The predominant secondary structure of these proteins consists of  $\alpha$ -helix. PhTX-I and PhTX-II induced neuromuscular paralyzing effect *ex vivo* in young chick biventer cervicis preparations, this activity was similar to other PLA<sub>2</sub> of snake venom. *In vivo*, PhTX-I and PhTX -II induced local myotoxicity and edema-forming activity, in addition, PhTX-I induces release of IL-6 after intramuscular injection in mice. *In vitro*, PhTX-I and PhTX -II were cytotoxic to the fibroblast cell line NIH-3T3 and NG97 derived from grade III human astrocytoma. Additionally PhTX-I induced low cytotoxicity in skeletal muscle myoblasts, however was able to lyse myotubes. Were made modifications chemical in PhTX-I specific amino acid residues and evaluated the pharmacological activities after modifications. Were modified one His and Trp, four Tyr and seven Lys residues. Analysis by circular dichroism demonstrated that secondary structure of protein remains practically unchanged. Evaluation of biological activities indicate a critical role of Lys and Tyr amino acid at myotoxicity, neuromuscular paralyzing effect, and especially cytotoxicity induced by PhTX-I. The catalytic activity of PhTX-I is relevant to the edematogenic, neuromuscular paralyzing and myotoxic effects, but not for their cytotoxic activity, since this effect is completely independent of the catalytic activity of PhTX-I, demonstrating the existence of molecular regions, different from the catalytic site, which may be responsible for at least some of the pharmacological properties of PhTX-I. We conclude that both the catalytic site and the hypothetical pharmacological site(s) are apparently relevant for the pharmacological profile of PhTX-I, although a partial dissociation between these activities has been demonstrated.

## 1. INTRODUÇÃO.

Envenenamento ofídico é um problema de saúde pública de grande importância em muitas regiões do mundo, particularmente na África, Ásia, América Latina e Papua Nova Guiné. Recentemente a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem incorporado o envenenamento ofídico em sua lista de doenças negligenciadas (Gutiérrez *et al.*, 2010).

A estimativa global de acidentes ofídicos é de 5,5 milhões de casos por ano, o que resulta em aproximadamente 400000 amputações e entre 20000 e 125000 mortes (Kasturiratne, *et al.*, 2008). Atualmente o único tratamento específico nos casos de envenenamento ocasionados por mordedura de serpente é a administração do soro antiofídico que, embora tenha reduzido à mortalidade devido à neutralização das toxinas que agem sistemicamente, muitas vezes é ineficiente na reversão dos danos tissulares locais. A eficácia do soro antiofídico é também restrita uma área geográfica e biológica limitada, devido à ampla diversidade imunológica do veneno (Gutiérrez *et al.*, 2006).

A fauna ofídica de interesse médico no Brasil está representada pelos gêneros *Bothrops* (incluindo *Bothriopsis* e *Porthidium*), *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* (Cardoso *et al.*, 2003).

### 1.1 Veneno de Serpentes.

O veneno das serpentes é composto de uma mistura de moléculas de natureza química diversa como proteínas, nucleotídeos e íons inorgânicos. Entre os compostos inorgânicos estão o cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco; outros componentes presentes no veneno incluem carboidratos (glicoproteínas), lipídeos (fosfolipídios), amins biogênicas, aminoácidos e nucleotídeos (Kini, 2003). Entretanto, a maior parte dos compostos presentes no veneno de serpente (90%) é formada por peptídeos e proteínas que são responsáveis pela ampla variedade de propriedades tóxicas do veneno (Koh *et al.*, 2006).

Em relação à porção protéica do veneno das serpentes, sabe-se que sua constituição é majoritariamente formada por enzimas como as fosfolipases A<sub>2</sub>, que são as mais estudadas devido a sua importância biológica (Calvete *et al.*, 2009). Entretanto, vários outros tipos de enzimas são encontradas nos venenos como: metaloproteases, serinoproteases, fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, L-amino oxidases, catalases, ATPases, hialuronidases, NAD nucleosidases, e L-glicosaminidases (Matsui *et al.*, 2000). Esta combinação de peptídeos e polipeptídios faz com que o veneno apresente diferentes propriedades tóxicas.

## 1.2 O veneno botrópico.

Os envenenamentos por espécies botrópicas (*Bothrops sp.*) caracterizam-se por uma fisiopatologia complexa que inclui principalmente efeitos locais (efeito paralisante neuromuscular, miotoxicidade, dermatonecrose, hemorragia, edema e dor) e, em casos moderados e severos, alterações sistêmicas como coagulopatias, sangria, choque cardiovascular e insuficiência renal aguda (Angulo e Lomonte, 2009). Evidentemente essas atividades são extremamente complexas e podem, usualmente, ser atribuídas a componentes específicos. No entanto, diferentes toxinas podem atuar de forma complementar ou sinérgica (Montecucco *et al.*, 2008), para induzir um determinado efeito, assim como também uma única toxina pode ter várias atividades farmacológicas (Huancahuire-Vega *et al.*, 2009).

A hiperalgesia é uma característica do envenenamento botrópico, este efeito tem sido estudado experimentalmente em ratos inoculados com veneno de *Bothrops jararaca* (Teixeira *et al.*, 2003), demonstrando ser mediado principalmente por prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (PAF). Em seguida está a descrição das atividades mais importantes do envenenamento botrópico:

### 1.2.1 Atividade hemorrágica.

Atividade hemorrágica é causada por toxinas denominadas hemorraginas. Estas enzimas são do tipo metaloprotease pois sua atividade enzimática depende da presença de um átomo de zinco no seu sítio ativo (Fox e Serrano, 2009). As hemorraginas podem romper a integridade do endotélio vascular e tem atividade desintegrina, além de serem potentes inibidores da agregação plaquetária. Já foram descritos e estudados os efeitos hemorrágicos de várias metaloproteases de espécies botrópicas, como é caso da BaP1, metaloprotease isolada de veneno de *Bothrops asper* (Rucavado *et al.*, 1995); BjussuMP-I, isolada de veneno de *Bothrops jararacussu* (Mazzi *et al.*, 2004); a jararagina, isolada de *Bothrops jararaca* (Kamiguiti *et al.*, 1994) e HFBm, metaloprotease de *B.marajoensis* (Torres-Huaco *et al.*, 2010), entre outras.

### 1.2.2 Atividade coagulante e agregação plaquetária.

O veneno botrópico possui capacidade de ativar fatores da coagulação sanguínea, ocasionando o consumo de fibrinogênio e formação de fibrina intravascular. Esta ativação induz frequentemente incoagulabilidade sanguínea, além de ativar a protrombina da cascata de coagulação sanguínea. A fração do veneno que possui esta ação coagulante atua de maneira diferente da trombina fisiológica, pois, não é neutralizada pela heparina (Kini, 2005). A batroxobina é uma enzima trombina símile isolada de veneno de *Bothrops atrox* que tem a capacidade de ativar o fator XIII da cascata de coagulação, imitando os efeitos da trombina (Marckland, 1998).

### 1.2.3 Atividade inflamatória.

A atividade inflamatória é causada por diversas frações do veneno botrópico, por exemplo: aminas biogênicas pré-formadas do tipo histamina, proteínas como PLA<sub>2s</sub>, esterases, proteases, enzimas liberadoras de cininas e lectinas. A atividade edematogênica é muito potente, e é evidenciada nos casos clínicos e nos modelos experimentais (Teixeira *et al.*, 2003). Nestes modelos as doses de veneno ou frações requeridas para induzir um efeito significativo variam de poucos microgramas a décimos de microgramas (Teixeira, *et al.*, 2003). Em estudos experimentais com a BaTX, uma PLA<sub>2</sub> homóloga isolada de *Bothrops alternatus*, verificou-se que uma dose de 2,5 µg é capaz de produzir edema no modelo coxim plantar de camundongo (Ponce-Soto *et al.*, 2007), por outro lado, 0,9 µg de veneno de *Bothrops asper* no mesmo modelo é capaz de induzir resposta inflamatória imediata causando um maior edema na extremidade injetada (Lomonte *et al.*, 1994). Resultados similares foram observados para os venenos *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. brazili*, *B. marajoensis* e as PLA<sub>2s</sub> isoladas de cada um desses venenos (Bonfim *et al.*, 2006; Calgarotto *et al.*, 2008; Huancahuire-Vega *et al.*, 2009; Ponce-Soto *et al.*, 2010).

### 1.2.4 Atividade miotóxica.

A mionecrose induzida por esses venenos tem dois mecanismos fundamentais: (1) ação direta de toxinas denominadas miotoxinas sobre as células musculares, originando lesão e (2) isquemia que se desencadeia no tecido como consequência do sangramento, compressão tissular e outras alterações inflamatórias que também contribuem para a mionecrose. Todas as miotoxinas

isoladas até o momento são proteínas com pesos moleculares ao redor de 14kDa, cujas propriedades estruturais permitem classificá-las como PLA<sub>2</sub>. As PLA<sub>2s</sub> de serpentes da família Viperidae estão subdivididas em dois subgrupos principais: PLA<sub>2s</sub> D49, as quais possuem um resíduo de Aspartato na posição 49, com alta atividade catalítica e PLA<sub>2s</sub> K49, com um resíduo de Lisina na posição 49, são proteínas com pouca ou nenhuma atividade catalítica (Selistre de Araújo *et al.*, 1996; Ownby *et al.*, 1999; Six e Dennis 2000). Ambos os tipos de PLA<sub>2s</sub> básicas induzem mionecrose quando injetadas em animais de laboratório (Ponce-Soto *et al.*, 2007; Lomonte, *et al.*, 2003; Gutiérrez e Ownby, 2003 e Gutiérrez, *et al.*, 2008). Além de induzir necrose muscular algumas destas miotoxinas apresentam outras atividades farmacológicas, causando edema e ação anticoagulante. As miotoxinas que foram mais bem caracterizadas são as dos venenos de *Bothrops asper*, *B. jararacussu*, *B. jararaca*, *B. newidi*, *B. pirajai*, *B. moojeni*, *B. marajoensis*, *B. pauloensis*, *B. alternatus*, *B. brazili*, pois é conhecida a seqüência de aminoácidos de algumas delas, assim como a sua estrutura cristalina (Kaiser *et al.*, 1990; Cintra *et al.*, 1993; Ponce-Soto *et al.*, 2007; Randazzo Moura *et al.*, 2008; Calgarotto *et al.*, 2008; Huancahuire-Vega *et al.*, 2009).

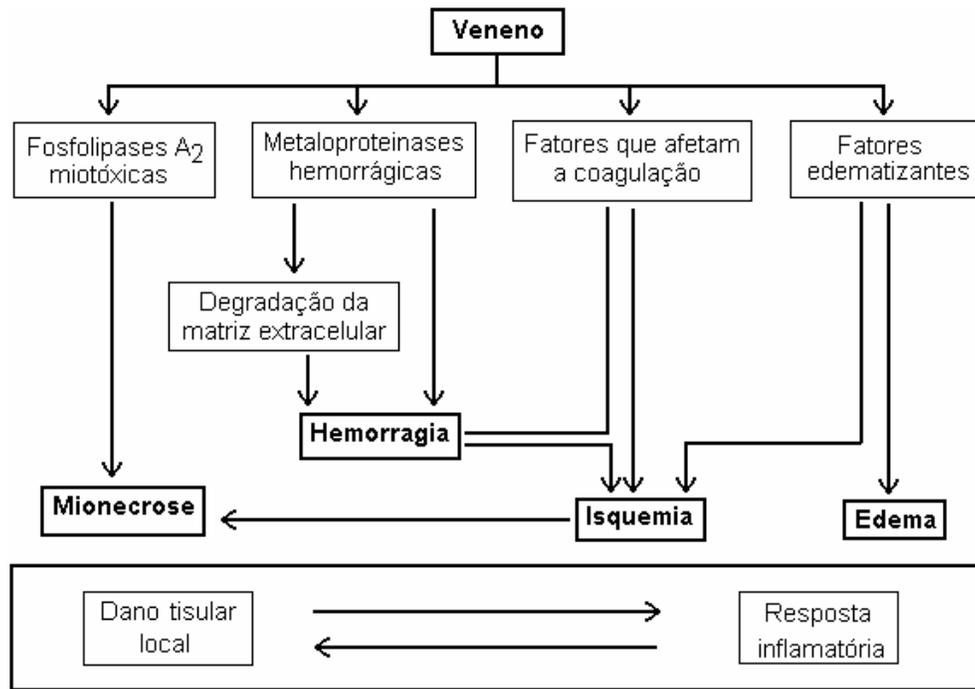
### 1.2.5 Atividade paralisante neuromuscular.

Estudos têm demonstrado que a peçonha de veneno Botrópico pode apresentar efeitos específicos sobre preparações neuromusculares isoladas, induzindo bloqueio da resposta muscular ou ainda produzindo sinais de paralisia neuromuscular “*ex vivo*” na preparação *biventer cervicis* de pintainho.

Esses efeitos passaram a ser descritos a partir do estudo do veneno de *Bothrops jararacussu* em preparações neuromusculares de rã (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983) revelando valiosas informações a respeito da ação paralisante neuromuscular. Estes efeitos se revelaram, através de estudos miográficos e de eletrofisiologia sendo atribuído à PLA<sub>2</sub> K49 denominada Bothropstoxina I (BthTX-I). Atualmente têm sido reportadas diversas PLA<sub>2s</sub> de diferentes serpentes botrópicas e crotálicas com este efeito biológico (Ponce-Soto *et al.*, 2007, Randazzo-Moura *et al.*, 2008, Calgarotto *et al.*, 2008).

As investigações em relação aos efeitos locais do veneno botrópico demonstram claramente que se trata de um quadro muito complexo em que participam e interagem uma série de toxinas que provocam desencadeamento de mecanismos endógenos (Fig. 1). Sem dúvida, permanece um

grande número de incógnitas em relação à patogênese destes efeitos, o que constitui um desafio para a investigação toxicológica.



**Figura 1** Hipótese sobre o desenvolvimento dos efeitos locais induzidos por venenos botrópicos (Gutiérrez e Lomonte, 2003).

### 1.3 Fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>).

As fosfolipases A<sub>2</sub> (EC 3.1.1.4) são enzimas que catalisam especificamente a hidrólise da ligação acil-éster na posição sn-2 do 1,2-diacil-3-sn fosfoglicerídeo em uma reação dependente de cálcio. (Magro *et al.*, 2009). As PLA<sub>2s</sub> têm papel fundamental no metabolismo de lipídeos e estão intimamente relacionadas com a liberação de ácido araquidônico, que é um precursor de lipídeos bioativos tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Há evidências de que estas enzimas poderiam também atuar em respostas imunológicas, inflamação, proliferação celular e vasoconstrição (Hanada *et al.*, 1995).

A superfamília das enzimas PLA<sub>2</sub> atualmente compreende em um grande número de proteínas diferentes, que podem ser divididas em cinco tipos principais denominadas: PLA<sub>2s</sub> secretórias (sPLA<sub>2</sub>), PLA<sub>2s</sub> citosólicas (cPLA<sub>2</sub>), PLA<sub>2s</sub> Ca<sup>2+</sup>-independentes (iPLA<sub>2</sub>), acetilhidrolases ativadoras de plaquetas (PAF-AH) e as PLA<sub>2s</sub> lisossomais. A atribuição das enzimas PLA<sub>2</sub> a um determinado grupo é baseado em seu mecanismo catalítico (His/Asp,

Ser/Asp ou Ser/His/Asp hidrolase), assim como as suas características funcionais e estruturais (Schaloske e Dennis, 2006).

As PLA<sub>2s</sub> secretórias (sPLA<sub>2</sub>) (Tabela 1), onde estão classificadas as PLA<sub>2s</sub> de veneno de serpentes, são proteínas pequenas (13-15 kDa) e comumente contém 7 pontes dissulfeto. Este grupo de enzimas possui um resíduo de histidina no sítio ativo e o Ca<sup>2+</sup> (concentração μM) é indispensável para a catálise. Na proximidade da histidina catalítica há um resíduo de aspartato conservado. As PLA<sub>2s</sub> de serpentes da família Viperidae encontram-se classificadas no grupo IIA e estão subdivididas em dois subgrupos principais: PLA<sub>2</sub> D49 e as PLA<sub>2</sub> K49 (Selistre de Araújo *et al.*, 1996; Ownby *et al.*, 1999; Six e Dennis 2000). Ambos os tipos de proteínas mostram significativa similaridade em sua estrutura tridimensional, no entanto exibem propriedades farmacológicas diferentes tornando-as alvos interessantes para o estudo de novas ferramentas moleculares (Magro *et al.*, 2009).

**Tabela 1.** Fosfolipases A<sub>2</sub> secretórias (sPLA<sub>2</sub>). Esta tabela foi adaptada de Six e Dennis, 2000.

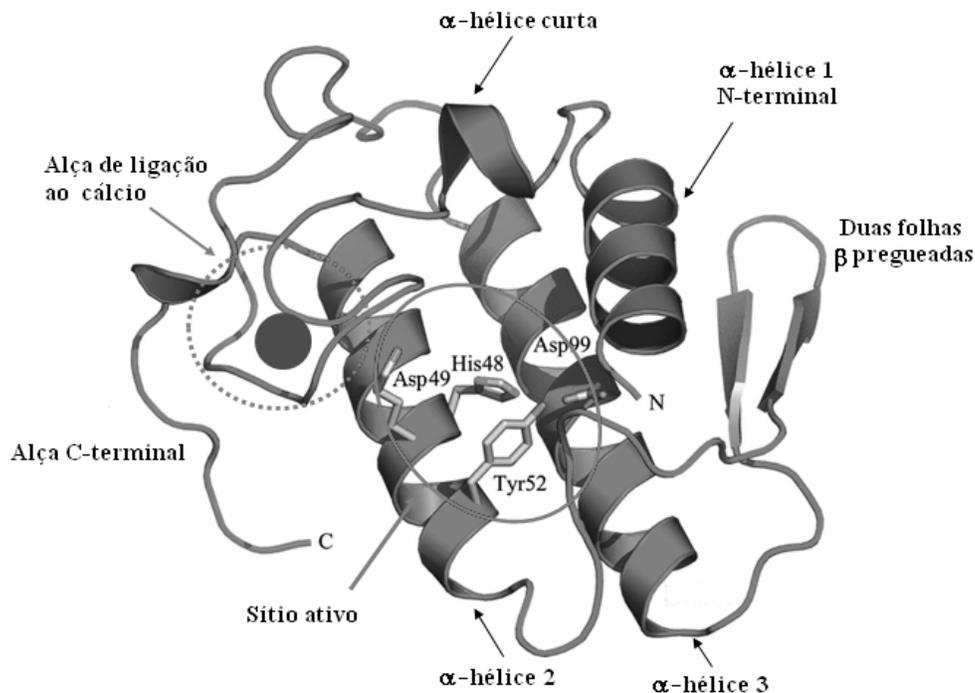
Grupo	Origem	Massa molecular (kDa)	Pontes dissulfeto
IA	Corais verdadeiros	13-15	7
IB	Pâncreas humano/porcino	13-15	7
IIA	Cascavéis, sinovial humano	13-15	7
IIB	Víboras Gaboon	13-15	6
IIC	Testículo rato/murino	15	8
IID	Baço/pâncreas humano/murino	14-15	7
IIE	Útero/coração/cérebro humano/murino	14-15	7
IIF	Embrião/testículo humano/murino	16-17	6
III	Humano/murino/lagartixa/abelha	15-18	8
V	Macrófago/pulmão humano/murino	14	6
IX	Veneno de aranha (conodipine-M)	14	6
X	Leucócito/timo/baço humano	14	8
XII	Murino/humano	19	7
XIII	Parvovirus	<10	0
XIV	Bactérias/fungos simbioses	13-19	2

#### 1.4 Estrutura e função das PLA<sub>2</sub>.

Atualmente foram isoladas e sequenciadas mais de 100 PLA<sub>2s</sub> de venenos de serpentes, com poucas exceções estas proteínas são altamente conservadas e contém em sua cadeia

polipeptídica entre 119 e 130 resíduos de aminoácidos. A maioria dos resíduos conservados participa diretamente na catálise ou ocupam posições sensíveis estruturalmente. Os 14 resíduos de cisteína conservados formam uma rede rígida de pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura terciária, conferindo a estas proteínas uma maior estabilidade em relação à variação de temperatura (Magro *et al.*, 2009).

A estrutura terciária das PLA<sub>2s</sub> de veneno de serpente é altamente conservada (Fig. 2) e está constituída por três segmentos em alfa hélice (hélices 1, 2 e 3), alças e folhas beta. Os resíduos polares do sítio catalítico (His48, Asp49, Asp99 e Tyr52) estão situados no interior do “canal hidrofóbico” formado por duas  $\alpha$ -hélices (2 e 3). As PLA<sub>2s</sub> estão constituídas também por uma região N-terminal, representada pela  $\alpha$ -hélice 1 (resíduos 1 – 12) e em seguida está localizada uma curta hélice (resíduos 18 – 23). Entre os resíduos 25 – 34 está a alça de ligação ao Ca<sup>2+</sup>, seguido pela  $\alpha$ -hélice 2 (resíduos 40 – 55) a qual se liga à folha  $\beta$ -antiparalela (resíduos 75 – 77 e 82 – 84). Por fim a  $\alpha$ -hélice 3 (resíduos 90 – 107) que se liga à alça C-terminal (resíduos 108 – 113) a qual é bastante flexível. A presença de 7 pontes dissulfeto é característica das PLA<sub>2</sub> do grupo IIA (Magro *et al.*, 2009).

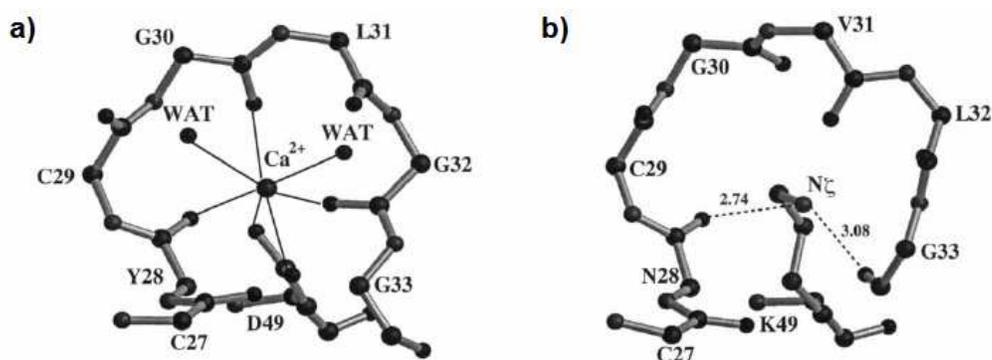


**Figura 2.** Representação em fita de uma PLA<sub>2</sub> (isoforma CB1 da crotoxina B do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (PDB id: 2QOG) – programa “PyMol” (DeLano, 2002). O íon Ca<sup>2+</sup> é representado como uma grande esfera preta.

Três regiões demonstram particularmente um alto grau de homologia na sequência de aminoácidos, estas regiões contribuem para a formação dos elementos estruturais secundários e terciários: hélice N-terminal (hélice 1), região de ligação ao cálcio e canal hidrofóbico (formado pelas hélices 2, 3 e pelo sítio catalítico). Esta última região se liga às caudas dos ácidos graxos dos fosfolipídios. As regiões menos conservadas correspondem aos elementos estruturais mais restritos e provavelmente são as regiões responsáveis pelos diversos efeitos farmacológicos das PLA<sub>2s</sub> de venenos (Kini, 2003).

O maior aspecto estrutural das PLA<sub>2s</sub> é uma plataforma definida por duas  $\alpha$ -hélices longas e antiparalelas ligadas por duas pontes dissulfeto (canal hidrofóbico). Estas duas hélices não mostram um caráter anfipático claro, tendo as cadeias laterais dos aminoácidos hidrofílicos geralmente expostos ao solvente e os aminoácidos hidrofóbicos apontando para o núcleo da proteína. Os aminoácidos que formam a rede catalítica (His-48, Asp-99 e Tyr-52) que estão situados nestas duas hélices constituem exceções importantes.

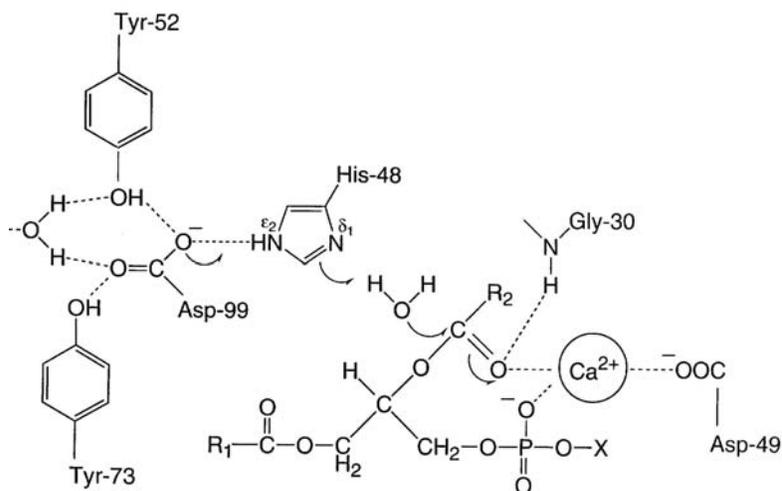
O cálcio é um cofator essencial na catálise e sua substituição por outros íons bivalentes, resulta na perda desta atividade (Yu *et al.*, 1993; Bonfim *et al.*, 2006). A figura 3 ilustra o sítio de união do cálcio, denominado “alça de ligação ao cálcio” (região 25-33), no qual o cátion é coordenado pelos átomos de oxigênio do carboxilato de Asp-99 e três átomos de oxigênio da cadeia principal. Duas moléculas de água completam a esfera de coordenação do íon cálcio formando uma bipirâmide pentagonal. Uma ponte dissulfeto (Cys27-Cys-44) segura à correta orientação relativa da alça de união do cálcio em relação aos aminoácidos que formam a rede catalítica.



**Figura 3:** Representação esquemática da alça de ligação do íon cálcio. (a) PLA<sub>2</sub> D49 cataliticamente ativa; o íon cálcio é mostrado com suas sete coordenações. (b) Região análoga na PLA<sub>2</sub> K49, cataliticamente inativa, o átomo N $\zeta$  da Lys49 ocupa a posição do íon cálcio formando duas pontes com os átomos de oxigênio da cadeia principal e uma ponte com uma única molécula de água (Ward *et al.*, 1998).

PLA<sub>2s</sub> homólogas que ocorrem na natureza onde o resíduo Asp49 (D49) é trocado por Lys (K49) (Maraganore *et al.*, 1984; Francis *et al.*, 1991; Ward *et al.*, 1995), Ser (Krizaj *et al.*, 1991) ou Ala (Liu *et al.*, 1991) não são cataliticamente ativas. A figura 3b mostra a representação esquemática de uma PLA<sub>2</sub> homóloga com o resíduo Lys49, revelando que o seu átomo N $\xi$  ocupa a posição do íon cálcio nas PLA<sub>2</sub> D49 (Holland *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1992; Arni *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1998).

O sítio catalítico das PLA<sub>2s</sub> compreende os resíduos His48, Tyr52, Asp99 e uma molécula de água. No mecanismo de catálise proposto (Fig. 4), o átomo N $\xi$ 1 do resíduo His48 está estabilizado por uma ligação com o oxigênio do resíduo Asp99, que por sua vez está ligada ao oxigênio do resíduo Tyr52; esta ligação esta totalmente conservada. O átomo N $\xi$ 1 do resíduo His48 se comporta como uma base polarizando e retirando um próton da molécula de água, esta por sua vez sempre está presente no sítio catalítico e participa da formação de um intermediário tetraédrico. A molécula de água promove o ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do substrato e subsequente à hidrólise da ligação acil-éster na posição sn-2 do fosfoglicerídeo (substrato), o próton é doado pelo anel imidazólico para o oxigênio que forma então o grupo álcool do lisofosfolípídeo a ser liberado e três moléculas de água se deslocam para dentro do sitio ativo (Verheij *et al.*, 1980).



**Figura 4.** Representação esquemática do mecanismo catalítico da PLA<sub>2</sub> (Janssen *et al.* 1999).

O íon cálcio está ligado pelos oxigênios da Tyr-28, Gly-30, Gly-32 e pelo oxigênio da cadeia lateral do Asp-49. No mecanismo da catálise o cálcio tem dupla função, fixar o fosfato e

estabilizar a carga negativa do oxigênio do grupo carbonil da ligação éster da posição sn-2 do substrato sendo um importante cofator enzimático das PLA<sub>2s</sub> de veneno (Yang, 1994).

Nas PLA<sub>2</sub> K49 a substituição do resíduo D49 por K49 afeta drasticamente a habilidade destas proteínas em ligar-se ao cofator Ca<sup>2+</sup>, o qual é preciso para a estabilização do intermediário tetraédrico na reação catalítica (Scott *et al.*, 1990) afetando drasticamente a atividade enzimática (Selistre de Araújo *et al.*, 1996; Ownby *et al.*, 1999; Magro *et al.*, 2009).

Atualmente um grande número de PLA<sub>2s</sub> D49 e PLA<sub>2</sub> homólogas K49 procedentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*, tem sido reportadas. Embora exista muita semelhança entre esta família de proteínas, a mutação de alguns resíduos de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica torna cada uma delas extremamente importante pela particularidade estrutural que está intimamente relacionada com a função farmacológica de cada uma (Ponce-Soto *et al.*, 2007; Calgarotto *et al.*, 2008; Randazo-Moura *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2008; Huancahuire-Vega *et al.*, 2009; Pereañez *et al.*, 2009).

### 1.5 Ação biológica das PLA<sub>2</sub>.

As PLA<sub>2s</sub> de serpentes desencadeiam vários efeitos farmacológicos tais como: neurotoxicidade pré e pós sináptica, miotoxicidade, atividade anticoagulante, hipotensiva, hemolítica, hemorrágica, edematogênica, entre outras (Kini, 2003; Gutierrez *et al.*, 2008). Esta diversidade de ações farmacológicas deriva de um processo micro-evolutivo acelerado, através do qual ocorre substituição de aminoácidos nas regiões moleculares localizadas, principalmente, na superfície destas moléculas (Ponce-Soto *et al.*, 2007; Randazo-Moura *et al.*, 2008).

Nas PLA<sub>2s</sub> D49, a maioria dos efeitos farmacológicos é produto da atividade enzimática, e a modificação dos resíduos catalíticos diminui tais efeitos, no entanto outras atividades são mantidas, indicando a existência de regiões diferentes ao sítio catalítico responsáveis por suas atividades tóxicas e farmacológicas (Soares *et al.*, 2001a).

Nas PLA<sub>2s</sub> K49 homólogas, a substituição do resíduo D49 por K49 afeta drasticamente a ligação do Ca<sup>2+</sup>, justificando sua baixa ou inexistente atividade catalítica. Apesar da inatividade catalítica as PLA<sub>2s</sub> K49 homólogas demonstram atividade lítica sobre membranas, por ações dependente de outros mecanismos e não através da liberação do ácido araquidônico (Selistre de Araújo *et al.*, 1996; Ownby *et al.*, 1999; Magro *et al.*, 2009).

Segundo Lomonte *et al.*, (2003) estas PLA<sub>2s</sub> K49 homólogas poderiam se ligar a determinados sítios com uma carga parcial negativa que poderia servir de ancoragem para as PLA<sub>2s</sub>. Estando unidas à membrana celular, poderiam gerar uma desorganização da membrana levando à alteração na permeabilidade e consequente destruição celular devido preferencialmente à desorganização celular mais do que pela toxicidade da PLA<sub>2</sub>.

Kini (2003) afirma que as PLA<sub>2s</sub> procedentes de veneno de serpentes possuem uma habilidade de se unir a um “sítio específico”, devido à sua alta afinidade por proteínas específicas que atuam como receptores. Essa ligação específica de PLA<sub>2</sub> se dispõe pela presença de um sítio “farmacológico” em sua superfície, que é independente do sítio catalítico.

## 1.6 Miotoxinas PLA<sub>2</sub>.

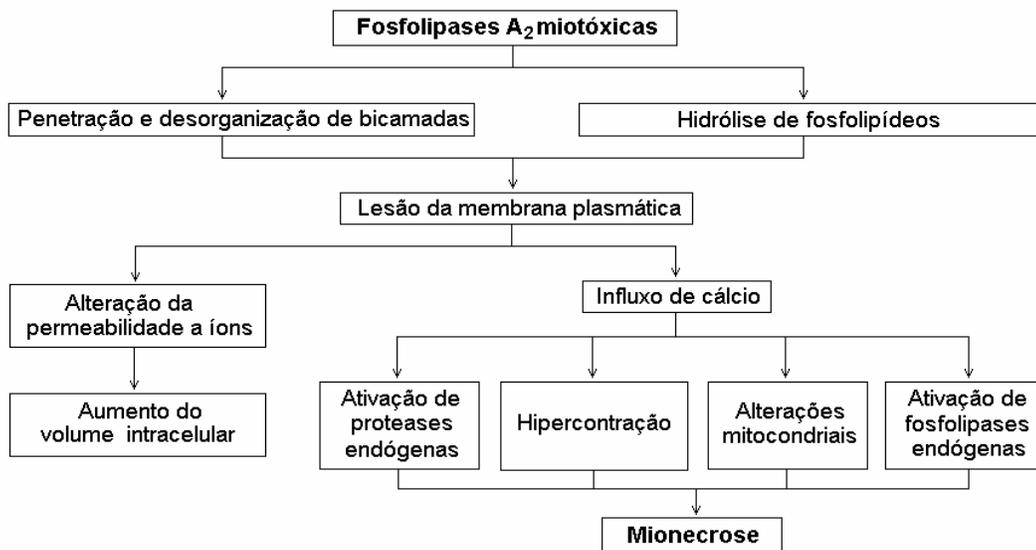
As miotoxinas PLA<sub>2</sub> são os componentes tóxicos principais e mais abundantes nos venenos de serpentes da família Viperidae. O modo de ação das PLA<sub>2s</sub> miotóxicas K49 e as D49 no músculo ocorrem por diferentes vias, mas no geral podem causar lise rápida do sarcolema e um rápido estado de mionecrose (Fletcher *et al.*, 1996). Essas miotoxinas PLA<sub>2</sub> também se caracterizam pelo seu forte caráter associativo em dímeros, que é a forma mais comum de polimerização encontrada para as PLA<sub>2s</sub> miotóxicas e, eventualmente, em tetrâmeros. Estas associações são principalmente dependentes de resíduos de tirosina (Y) (Arni e Ward, 1996; Bonfim *et al.*, 2006).

As miotoxinas PLA<sub>2</sub> isoladas até o presente momento são moléculas compactas, estáveis às variações de temperatura, pH, concentração salina alta e na presença de solventes orgânicos. Devido a estas características não se desnaturam em condições usuais de trabalho durante os processos de purificação e testes biológicos (Gutierrez e Lomonte, 1995). Estas características são acentuadas principalmente quando as PLA<sub>2s</sub> se encontram associadas, por exemplo, em dímeros, o que é comum para as PLA<sub>2s</sub> K49 homólogas.

As PLA<sub>2s</sub> miotóxicas que foram caracterizadas são dos venenos de *Bothrops asper*, *B. jararacussu*, *B. jararaca*, *B. newidi*, *B. pirajai*, *B. moojeni*, *B. marajoensis*, *B. pauloensis*, *B. alternatus*, *B. brazili*, *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus ruruima* etc. Sendo conhecido a sequência de aminoácidos de algumas delas e a sua estrutura cristalina (Kaiser *et al.*, 1990; Cintra *et al.*, 1993; Ponce-Soto *et al.*, 2007; Calgarotto *et al.*, 2008; Randazzo Moura *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2012).

Apesar de suas diferenças na atividade enzimática, PLA<sub>2s</sub> D49 e K49 são miotóxicas, implicando em dois diferentes mecanismos de ação. Miotoxinas PLA<sub>2</sub> D49 dependem de sua atividade catalítica para produzir necrose nas fibras musculares (Gutiérrez e Ownby, 2003). Em contraste, as PLA<sub>2</sub> K49 miotóxicas, cataliticamente inativas, utilizam como principal determinante de toxicidade um sítio que abrange os resíduos de aminoácidos entre 115 e 129 na região C-terminal, o qual inclui uma combinação variável de resíduos catiônicos e aromáticos/hidrofóbicos (Lomonte *et al.*, 2003). Existem evidências de que ambos os tipos de miotoxinas alteram a permeabilidade da membrana plasmática e iniciam uma série de eventos degenerativos cujos mecanismos moleculares envolvidos ainda estão pobremente caracterizados (Montecucco *et al.*, 2008).

Uma vez produzida lesão na membrana plasmática, ocorre uma entrada maciça de cálcio, o que gera pequenas alterações na membrana plasmática, denominadas lesões delta, hipercontração dos miofilamentos, alterações mitocondriais, ruptura das membranas e formação de densidades floculentas que resultam da aglomeração de proteínas da membrana interna da mitocôndria (Gutiérrez e Ownby, 2003). O desarranjo dos componentes fosfolipídicos ocasiona severas alterações na integridade estrutural e funcional das membranas plasmáticas, com consequente influxo de íons Ca<sup>2+</sup>, acarretando a liberação de proteases dependentes de Ca<sup>2+</sup>, ativação de PLA<sub>2s</sub> endógenas e o colapso mitocondrial. A Figura 5 mostra um resumo da hipótese para o mecanismo de ação celular das miotoxinas PLA<sub>2</sub>.



**Figura 5** Hipótese sobre o mecanismo de ação das fosfolipases A<sub>2</sub> miotóxicas do veneno de *Bothrops* sp. (Gutiérrez e Lomonte, 2003).

### 1.7 Neurotoxinas PLA<sub>2</sub>.

As neurotoxinas PLA<sub>2</sub> são geralmente pré-sinápticas ( $\beta$  neurotoxinas), as quais inibem o processo de liberação da acetilcolina. As neurotoxinas PLA<sub>2</sub> são caracterizadas pela presença da atividade PLA<sub>2</sub> e tem sido encontradas nos venenos de serpentes das famílias *Elapidae*, *Crotalidae* e *Viperidae*. Como exemplo temos a MiDCA1, uma neurotoxina PLA<sub>2</sub> isolada de veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda* que produz bloqueio neuromuscular em preparações neuromusculares de vertebrados. (Dal Belo *et al.*, 2005).

Envenenamentos por veneno botrópico não produzem sinais de neurotoxicidade clinicamente relevantes. Entretanto, várias PLA<sub>2s</sub> isoladas a partir destes venenos bloqueiam a transmissão neuromuscular em preparações neuromusculares “*ex vivo*” de ave e mamífero (Ponce-Soto *et al.*, 2007; Calgarotto *et al.*, 2008; Randazzo-Moura *et al.*, 2008; Romero-Vargas *et al.*, 2010). O bloqueio neuromuscular destas PLA<sub>2s</sub> tem sido confundido com uma ação neurotóxica destas toxinas, Gallaci e Cavalcante (2010) sugerem que o bloqueio neuromuscular induzido pelas PLA<sub>2s</sub> K49 homólogas pode ser ocasionado como consequência de uma ação desestabilizadora da membrana plasmática.

### 1.8 Modificações químicas das PLA<sub>2</sub>.

As relações estrutura-função de várias PLA<sub>2s</sub> provenientes de venenos de serpente têm sido extensamente pesquisadas. Com objetivo de elucidar estruturalmente os sítios responsáveis pela toxicidade tem-se utilizado várias metodologias, tais como modificações químicas, mutações sitio-dirigidas, técnicas cristalográficas, espectrofotométricas e fluorométricas, ressonância magnética nuclear e estudos da ação de inibidores e substratos naturais ou artificiais (Soares e Giglio, 2003). As modificações químicas têm sido uma das principais estratégias usadas para estudar suas relações estrutura-função.

A contribuição de uma variedade de reagentes muito específicos tem sido usados para modificar quase todos os grupos funcionais presentes nas PLAs (Tabela 2), obviamente a principal finalidade destes estudos é apontar com precisão aos resíduos do sitio ativo para obter uma visão do mecanismo de ação da PLA<sub>2</sub>.

É altamente aceito que as PLA<sub>2s</sub> de veneno de serpente mostram uma ampla variedade de atividades farmacológicas. Tal diversidade funcional dentro desse grupo de proteínas estruturalmente similares cria interrogações concernentes à relação entre sua estrutura e sua

função. Uma tentativa de esclarecer a relação entre a atividade enzimática e a toxicidade é feita através dos estudos de modificação seletiva ou preferencial dos grupos da cadeia lateral de aminoácidos na molécula da enzima PLA<sub>2</sub> e comparar os efeitos farmacológicos destas modificações (Verheij, 1981; Yang, 1997).

**Tabela 2.** Estratégias para modificações químicas de resíduos de aminoácidos específicos em PLA<sub>2</sub> miotóxicas de venenos de serpentes (Soares *et al.*, 2003).

Resíduo de aminoácido	Reagente/reacção
His	<i>p</i> -Bromophenacil bromide (BPB)/alquilação
	Metil- <i>p</i> -nitrobenzenosulfonato/metilação
Lys	Cianeto de potássio/carbamilação
	<i>o</i> -Metilisourea/guanidinação
	Acido acético anidro/acetilação
Tyr	Trinitrobenzenosulfonato (TNBS)/trinitrofenilação
	Nitrobenzeno sulfonil fluoride (NBSF)/sulfonação
Trp	Nitrofenil sulfonil chloride (NPSC)/sulfonação
	2-Hidroxi-5-nitrobenzil bromide/alquilação
Met	Cloramina T/oxidação
	Acido iodoacético/carboximetilação

### 1.9 Ferramentas moleculares.

O isolamento e estudo dos componentes individuais de veneno de serpentes são a base para compreender melhor a fisiopatologia do envenenamento, contribuindo potencialmente para melhorar as modalidades terapêuticas na clínica e também abre possibilidades para a descoberta de novas toxinas que poderiam ser úteis como ferramentas em processos moleculares de importância biomédica, assim como a descoberta de novos fármacos de uso clínico (Angulo e Lomonte, 2009).

O veneno de serpente é uma fonte rica de componentes naturais com alta afinidade e seletividade para um âmbito diverso de alvos biológicos, especialmente proteínas de membrana, como canais de íons, receptores e transportadores (Lewis e Garcia, 2003). A alta potencia e especificidade de muitas proteínas derivadas de veneno, a facilidade de sua síntese química e/ou produção recombinante e a resistência à degradação proteolítica, são atributos que fazem destas proteínas atrativas para o desenvolvimento de fármacos modernos (Harvey, 1995).

Já na década de 1970 o fármaco anti-hipertensivo captopril foi desenvolvido a partir de um peptídeo isolado da serpente brasileira *B. jararaca* (Cushman e Ondetti, 1991). Recentemente vários novos fármacos têm surgido a partir da descoberta de toxinas de veneno de serpentes como a integrilina, isolada de *Sistrurus miliaris barbouri*, a qual inibe a agregação plaquetária sendo usada na angioplastia coronária, a defibrase, isolada de *B. moojeni*, inibe a ação da trombina e protrombina, é usada no infarto cerebral agudo e na angina peitoral, a hemocoagulase, isolada de *B. atrox*, utilizada na prevenção e tratamento da hemorragia e a reptilase, isolada de *B. jararaca*, usada no diagnóstico de desordens da coagulação sanguínea (Fox e Serrano, 2008). Estes e vários outros fármacos encontram-se em diferentes etapas de desenvolvimento pré-clínico ou clínico.

#### **1.10** *Porthidium hyoprora*.

De um modo geral, pouco é conhecido da serpente *P. hyoprora*, inicialmente descrita por Amaral (1935), espécie venenosa que pertence à família Viperidae, amplamente espalhada na região da Amazônia do Brasil, Equador, Peru e Colômbia (Campell e Lamar 2004).

Relatos clínicos e epidemiológicos de envenenamento pelos gêneros *Bothrops*, *Porthidium* e *Botriechis* mostraram que as atividades edematogênicas, hemorrágicas e miotóxicas do veneno de *P. hyoprora* foram similares às espécies *Bothrops* (Campos *et al.*, 1999; Otero *et al.*, 2002). Alguns pesquisadores preferem usar o termo “envenenamento botrópico” devido às similaridades das manifestações clínicas produzidas pelos venenos destas espécies.

A caracterização bioquímica e farmacológica de muitas PLA<sub>2s</sub> de venenos botrópicos e crotálicos tem sido documentada. Entretanto, não existe informação acerca de PLA<sub>2</sub> do veneno de *P. hyoprora*. Assim, estudos farmacológicos envolvendo PLA<sub>2s</sub> purificadas a partir do veneno de *P. hyoprora* são necessários, uma vez, que estas toxinas são os principais componentes do veneno responsáveis pela necrose muscular e respostas inflamatórias nos envenenamentos (Gutiérrez e Lomonte, 1997; Kini, 2003).

## **2. OBJETIVOS.**

### **2.1 Objetivo geral.**

Purificar, caracterizar bioquímica e farmacologicamente as PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II a partir do veneno de *P. hyoprora* e entender as relações estrutura-função da PLA<sub>2</sub> PhTX-I, através de modificações químicas de resíduos de aminoácidos específicos.

### **2.2 Objetivos específicos.**

- Purificar as PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II a partir do veneno de *P. hyoprora* através de cromatografia de alta eficiência (HPLC) de fase reversa.
- Caracterizar bioquimicamente as PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II através de determinação da massa molecular, estrutura primária, secundária, análise de aminoácidos e cinética enzimática.
- Caracterizar farmacologicamente o veneno total e as PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II através de efeito paralisante neuromuscular, miotoxicidade local e sistêmica, atividade edematogênica e citotóxica.
- Realizar modificações químicas nos resíduos His, Lys Tyr e Trp na PLA<sub>2</sub> PhTX-I e avaliar os efeitos de tais modificações sobre as suas propriedades enzimáticas, farmacológicas e estruturais.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS.**

#### **3.1 Veneno e reagentes.**

O veneno foi gentilmente cedido pela professora Corina Vera Gonzáles, do Instituto de Biomedicina y Biotecnologia de Arequipa – Perú. Todos os solventes, produtos químicos e reagentes utilizados são de grau HPLC, grau seqüência ou de alto grau de pureza, obtidos da Sigma, Aldrich Chemicals, Merk e Bio Rad.

#### **3.2 Animais.**

Para os ensaios biológicos, foram utilizados camundongos machos Swiss (18 a 20 g) e pintainhos HY-Line W36 de 4 a 8 dias, obtidos do Biotério Central da Unicamp, mantidos a 24-28 °C com alimentos e água *ad libitum*. Todos os ensaios biológicos foram feitos com autorização da Comissão de Ética para a Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP protocolo n° 1860-1).

#### **3.3 Purificação das PLA<sub>2</sub> em HPLC de fase reversa.**

O sistema cromatográfico usado foi o HPLC - PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, um injetor automático de amostras U6K com um “loop” de 200 µL e uma coluna µ-Bondapak C18 (3,9 x 300 mm, Waters), previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1 %, (v/v) (tampão A) pH 3,5. Brevemente, 5 mg de veneno total foram dissolvidas em 200 µl de TFA 0,1%, a solução obtida foi centrifugada para clarificação e o sobrenadante aplicado na coluna. As proteínas foram eluídas usando-se uma gradiente linear contínua (0-100 %) do tampão B (acetonitrila 66,5 %, TFA 0,1 %). O fluxo foi mantido constante a 1 ml/min e monitorado a 280 nm. As frações obtidas foram liofilizadas e armazenadas a -20 °C.

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

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

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

### **3.5 Atividade Fosfolipásica A<sub>2</sub>.**

A determinação da atividade PLA<sub>2</sub> foi realizada segundo o método descrito por Cho e Kézdy (1991), Holzer e Mackessy (1996) e adaptado para microplaca (Ponce-Soto *et al*, 2007).

A mistura para o ensaio conteve 200 µl de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM e NaCl 100 mM pH 8), 20 µl do substrato cromogênico ácido 4-nitro-(3-octanoiloxi) benzóico (NOAB), 20 µl de água ou 20 µl de amostra (PLA<sub>2</sub>), em volume final de 260 µl. Após a adição de 20 µl das PLA<sub>2</sub> em teste, a mistura foi incubada por 40 minutos a 37 °C e as absorbâncias foram lidas a intervalos de 10 minutos. A atividade enzimática expressa como a velocidade inicial da reação ( $V_0$ ) foi calculada baseada no aumento da absorbância após 20 minutos. O ensaio foi realizado em triplicata, monitorando a formação do produto ácido 4-nitro-(3 hidroxil) benzóico (cromóforo), lendo-se a absorvância a 425 nm em um VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Uma unidade enzimática (UE) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 nmol de produto por minuto.

### **3.6 Estudos cinéticos.**

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

Os ensaios do efeito do pH sobre a atividade PLA<sub>2</sub> foram realizados em meios de reação preparados com diferentes valores de pH (4-10). Para cada pH foi feito um controle e a determinação da atividade PLA<sub>2</sub> foi feita conforme ao item 3.5. Os tampões utilizados nos experimentos foram: tampão Citrato de sódio pHs 4, 5 e 6, tampão Tris-HCl pHs 7 e 8, tampão Glicina pHs 9 e 10.

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

Para determinação da temperatura ótima, estudamos a atividade PLA<sub>2</sub> em meios de reação de 25, 30, 35, 37, 40 e 45 °C. A atividade enzimática foi determinada conforme ao item 3.5.

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

Este ensaio foi feito variando-se a concentração do substrato cromogênico NOAB. As concentrações utilizadas são: 40, 20, 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,2 e 0,1 mM. A metodologia utilizada foi conforme ao item 3.5.

### **3.6.4 Efeito de íons divalentes na atividade PLA<sub>2</sub>.**

A atividade das PLA<sub>2</sub> foi estudada na presença dos íons divalentes: Mg<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup> e Zn<sup>+2</sup>. Para a preparação dos tampões, foram usados sais dos respectivos metais (MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>) e a determinação da atividade PLA<sub>2</sub> foi feita conforme ao item 3.5.

### **3.6.5 Estudos de inibição enzimática.**

Foi avaliado o efeito inibitório da heparina de porco (*Mr* 6,000) e EDTA sobre a atividade enzimática das PLA<sub>2</sub>. Os ensaios foram realizados incubando a heparina com as toxinas em proporção molar de 2:1 ou com EDTA 1mM durante 30 min a 37 °C, a determinação da atividade PLA<sub>2</sub> foi feita conforme ao item 3.5.

### **3.7 Análise de aminoácidos.**

A análise de aminoácidos das PLA<sub>2</sub> foi realizada no analisador automático de aminoácidos PICO TAG (Sistema Waters) seguindo a metodologia descrita por Henrikson e Meredith (1984). Os aminoácidos derivatizados (PTC aminoácidos) das amostras foram 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 Ponce-Soto, *et al.*, (2007).

### **3.8 Determinação da massa molecular por espectrometria de massas Maldi-tof**

A massa molecular das PLA<sub>2</sub> nativas e alquiladas foi analisada por espectrometria de massas utilizando-se um Voyager DE PRO MALDI TOF mass spectrometry (Applied

Biosystems, Foster City, CA, USA), equipado com um laser de nitrogênio (337 nm, pulso 4 ns). 1 µl das amostras em TFA 0,1 % foi misturada em 2 µl da matriz de ácido sinapínico (ácido 3, 5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic). A matriz foi preparada com 30 % de acetonitrila e 0,1 % de TFA. As massas foram analisadas sob as seguintes condições: aceleração de voltagem 25 kV o laser ajustado a 2890 mJ/cm<sup>2</sup> em 300 ns e modo de análise linear (Ponce-Soto *et al.*, 2006).

### **3.9 Determinação da estrutura primária.**

#### **3.9.1 Redução e alquilação.**

As proteínas (PLA<sub>2</sub>) liofilizadas purificadas em HPLC de fase reversa foram re-suspendida em ureia 8 M contendo DTT 10 mM a pH 8 e incubada a 37 °C por duas horas para redução das pontes dissulfeto. Iodoacetamida foi utilizada para alquilar o grupo tiol livre a partir dos resíduos de cisteína reduzidos. Apoiados em experimentos prévios foi escolhido um excesso molar em 30 % de iodoacetamida em relação ao número total de tióis. A mistura foi incubada por 1,5 horas a 37 °C no escuro. A reação foi interrompida injetando a mistura em uma coluna de HPLC de fase reversa seguida de liofilização dos picos coletados.

#### **3.9.2 Hidrólise enzimática.**

As proteínas purificadas foram hidrolisadas com tripsina pancreática bovina de grau sequencia em bicarbonato de amônio 0,4 % pH 8,5 durante 4 horas a 37 °C em uma proporção enzima: substrato de 1:100 (v/v). A reação foi interrompida por liofilização.

#### **3.9.3 Espectrometria de massas em tandem.**

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

### **3.9.4 Sequenciamento “de novo” dos peptídeos trípticos.**

Peptídeos trípticos alquilados a partir das PLA<sub>2</sub> foram separados em HPLC de fase reversa, coletados manualmente, liofilizados e re-suspendidos em 20 % de acetonitrila e 0,1 % de TFA.

Cada peptídeo foi introduzido por separado na fonte do espectrômetro de massa com uma seringa a um fluxo de 500 nl/min<sup>-1</sup>. Ante de realizar os espectros de massa em tandem foi adquirido um espectro ESI/MS (modo TOF MS) para cada pico obtido do HPLC de fase reversa na faixa de 400–2000 m/z para selecionar os íons de interesse. Posteriormente esses íons foram fragmentados em uma célula de colisão (modo TOF MS/MS). Diferentes energias de colisão foram utilizadas dependendo do estado de carga e massa dos íons. Os espectros resultantes foram adquiridos no analisador TOF e resolvidos usando o software MassLynx-MaxEnt 3 algorithm. Espectros com uma carga só foram processados manualmente usando o aplicativo PepSeq incluído no MassLynx.

### **3.10 Modificações químicas da PLA<sub>2</sub> PhTX-I.**

#### **3.10.1 Alquilação de histina com 2,4'-Dibromoacetophenone (BPB).**

A modificação química no resíduo de Histidina com BPB foi executada usando tampão Tris-HCl. Brevemente, 3 mg da toxina foi dissolvida em 1 ml de tampão Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 contendo 0.7 mM de EDTA e 150 µl de BPB (1,5 mg/ml em etanol). A mistura foi incubada por 24 h a 25 °C. A proteína foi separada do reagente por ultrafiltração através de uma membrana Amicom YM-3 e lavada com água ou bicarbonato de amônio 0.05 M pH 8.0, seguido por liofilização (Diaz-Oreiro e Gutiérrez, 1997).

#### **3.10.2 Acetilação de lisina com anidro acético (AA).**

A modificação química de resíduos de lisina foi realizada em uma relação molar proteína:reagente de 1:50. A proteína (3 mg) foi dissolvida em 1.5 ml de Tris-HCl 0.2 M, pH 8.0, e é adicionado 10 µl de anidro acético (Merck, U.S.A.). O pH foi ajustado novamente para pH 8.0 com NaOH após a adição do anidro acético. Depois de 1 h de incubação a 25 °C, a proteína foi separada do reagente por ultrafiltração através de uma membrana Amicom YM-3 e lavada com água ou bicarbonato de amônio 0.05 M pH 8.0, seguido por liofilização (Diaz-Oreiro e Gutiérrez, 1997).

### 3.10.3 Sulfonilação de tirosina com 4-Nitrobenzenesulfonil fluoride (NBSF).

Os resíduos de tirosina foram modificados com NBSF essencialmente de acordo com o procedimento descrito por Liao *et al.* 1982. Um micromol de enzima PLA<sub>2</sub> em 14 ml de tampão Tris-HCL 0.1 M pH 8.0 foi incubado com 9 µmol de NBSF. A reação foi realizada a 25 °C por 1 h e a mistura foi rapidamente separada, tirando o excesso de reagente por ultrafiltração através de uma membrana Amicom YM-3 e lavada com água ou bicarbonato de amônio 0.05 M pH 8.0, seguido por liofilização.

### 3.10.4 Sulfonilação de triptofano com 2-Nitrobenzenesulfonil chloride (NPSC).

Modificação de resíduos de triptofano foi realizada segundo Takasaki *et al.* 1990. Brevemente, 9 mg de proteína foram dissolvidos em 4 ml de ácido acético 50 % contendo 1 mg de NPSC e incubados por 1 h a 25 °C. A mistura foi rapidamente separada, tirando o excesso de reagente por ultrafiltração através de uma membrana Amicom YM-3 e lavada com água ou bicarbonato de amônio 0.05 M pH 8.0, seguido por liofilização.

## 3.11 Determinação da massa molecular das proteínas modificadas por espectrometria de massas Electrospray (ESI).

Uma aliquota de cada proteína (4.5 µl) foi injetada em uma coluna C18 UPLC de fase reversa (nanoAcquity UPLC, Waters) acoplada com um sistema de espectrometria de massas em tándem nano-electrospray em um espectrômetro de massa Q-ToF Ultima API (MicroMass/Waters) a um fluxo de 600 nl/min. A gradiente foi de 0-50 % de acetonitrila em ácido fórmico 0.1 % durante 45 min. O instrumento foi operado em modo MS contínuo e a aquisição de dados foi de 100-3000 *m/z* a velocidade de 1s e um delay de 0,1 s. Os espectros foram acumulados cerca de 300 scans e os múltiplos dados carregados produzidos pelo espectrômetro de massa na escala *m/z* foram convertidos para escala de massa (massa molecular) usando o software Maxium Entropy fornecido com o pacote Masslynx 4.1. Os parâmetros de processamento foram: faixa de massa de saída 6000-20000 Da com resolução de 0.1 Da/canal; a proporção de intensidade mínima entre picos sucessivos é 20 % (esquerdo e direito). O espectro deconvolucionado foi então suavizado (canais 2x3, Savitzky Golay smooth) e os valores de massa obtidos usando o 80 % do topo do pico e a largura mínima do pico a meia altura de quatro canais.

### 3.12 Espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD).

Os experimentos de CD foram realizados em um espectropolarímetro J-720 (JASCO), acoplado a um sistema interno de controle de temperatura (Peltier Type Control System PFD 425 – JASCO) e controlador externo de temperatura (NESLAB RTE Series – NESLAB). As cubetas de quartzo usadas possuíam caminho ótico de 1 mm ou 0,1 mm e as proteínas suficientemente para fornecer um sinal em 222 nm entre -20 e -40 mDeg. A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Edelhock (1967). Os programas utilizados para o registro e tratamento dos dados são o Spectra Manager® (JASCO) e o Origin® (Microcal) respectivamente. Os espectros CD foram normalizados em elipticidade molar residual (EMR) ou  $[\Theta]$  pela aplicação da seguinte equação:

$$\text{EMR} = \frac{\Theta \times \text{MM}}{10 \times C \times l \times n}$$

Onde  $\Theta$  é a elipticidade (mDeg), MM é a massa molecular (g/mol), C é a concentração da proteína (mg/ml), l é o comprimento de caminho ótico (cm) e n o número de resíduos de aminoácidos da proteína. Os dados de EMR são representados em função de  $\lambda$  (nm).

### 3.13 Espectros de dicroísmo circular

Os espectros de CD foram coletados em temperatura ambiente. Os espectros de CD em ultravioleta distante iniciavam em 260 nm e cobrem até a banda na qual a voltagem do detector atingisse o limite de 700 Volts. Bandas com voltagens superiores, porventura coletadas, ocasionadas por sal ou excesso da proteína foram descartados dos espectros analisados. Espectros cumulativos de 20 coletas (velocidade de coleta = 100 nm/min e tempo de resposta do detector de 1 segundo) foram analisados como descrito acima, após subtração do espectro do respectivo tampão (Fosfato de sódio 10 mM, pH 8) acumulado 10 vezes. A porcentagem de estrutura secundária do tipo  $\alpha$ -hélice, folha  $\beta$ -pregueada e estrutura randômica foi calculada com o auxílio do programa CDNN Deconvolution (Versão 2 – Bioinformatik.biochemtech.uni-halle.dee/cdnn). Este programa compara o espectro de CD normalizado em EMR com um banco de dado de 13, 23 ou 33 espectros em EMR de proteínas cuja estrutura em alta resolução é determinada (Corrêa e Ramos, 2009).

### **3.14 Determinação das atividades farmacológicas.**

#### **3.14.1 Medida da atividade paralisante neuromuscular em músculo *biventer cervicis* de pintainho.**

Os animais foram anestesiados com halotano e sacrificados por dessangramento. O músculo *biventer cervicis* foi removido e montado sob uma tensão de 0,5 g em 5 ml de banho órgão (Automatic organ multiple-bath LE01 Letica Scientific Instruments. Barcelona, Spain) a 37 °C contendo solução Krebs (pH 7.5) areada (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>) da seguinte composição (em mM): NaCl 118.7, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 1.88, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.17, MgSO<sub>4</sub> 1.17, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 e glucose 11.65.

Para a contratura foi aplicada exogenamente Acetilcolina (ACh; 110 µM por 60 s) e KCl (20 mM por 130 s), foi obtido na ausência da estimulação de campo, antes da adição das toxinas PLA<sub>2</sub> nas concentrações finais de 0.35, 0.7, 1,4 e 3.5 µM e do veneno total (20 µg/ml). Um eletrodo bipolar de anel de platino foi colocado ao redor do tendão o qual recorre o músculo inervado. Estimulação indireta foi realizada com um Estimulador (MAIN BOX LE 12404 Panlab s.l. Powerlab AD Instruments Barcelona, Spain) sob as seguintes condições: 0.1 Hz, 0.2 ms, 3-4 V.

Contrações musculares e contraturas foram registradas isometricamente durante 120 min, por transdutores de força (Modelo MLT0201 Force transducer 5 mg-25 g Panlab s.l. AD Instruments Pty Ltd. Spain) ligados a um amplificador e a um sistema de aquisição de dados PowerLab/4SP (OUAD Bridge AD Instruments, Barcelona, Spain) Ponce-Soto *et al.*, (2007).

#### **3.14.2 Determinação dos níveis de CK plasmáticos em camundongos inoculados por via intramuscular (miotoxicidade local) e intravenosa (miotoxicidade sistêmica).**

Para a determinação das atividades miotóxica local e sistêmica induzidas a partir da exposição às PLA<sub>2</sub> e ao veneno total, grupos de 4 camundongos (18 a 20 g) receberam injeções intramusculares (músculo gastrocnêmio) e intravenosas (veia da cauda) respectivamente, de quantidades variadas das PLA<sub>2</sub> e do veneno total dissolvidas em 50 µl de tampão PBS, sendo que o grupo controle recebeu apenas PBS.

Após a aplicação das toxinas, em intervalos de tempo (1, 3, 6, 9 e 24 horas), amostras de sangue foram coletadas da cauda em capilares heparinizados e o plasma foi removido para a determinação dos níveis plasmáticos de creatina-quinase (CK) (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Esta atividade enzimática foi medida através do ensaio cinético utilizando o kit CK–NAC UV unitest (Wiener lab.), assim, 200 µl do substrato reconstituído foram pré-incubados por 4 minutos a 37°C, logo foram acrescentados 5 µl de plasma obtido por centrifugação do sangrado da cauda do camundongo. A mistura foi incubada por 6 minutos, registrando as leituras dos minutos 3, 4, 5 e 6. A diferença média de absorbância por minuto ( $\Delta A/\text{min}$ ) foi determinada, diminuindo-se cada leitura da anterior e tirando-se a média dos valores. A média foi multiplicada pelo fator 8095 (Kit de CK Winer lab). As leituras foram feitas a 340 nm, monitorando a formação do produto NADPH (A atividade da CK é monitorada através de 3 reações acopladas onde o produto final é o NADPH). A atividade foi expressa em U/L, definida como a fosforilação de 1 mmol de creatina/min a 25 °C.

### **3.14.3 Determinação da atividade edematogênica (edema de pata).**

Para a determinação da atividade edematogênica ocasionada pelas toxinas PLA<sub>2</sub> e pelo veneno total, grupos de 4 camundongos (18-20 g) receberam injeções subcutâneas na pata direita. Veneno total (1µg) e as PLA<sub>2</sub> (1µg) foram dissolvidos em 50 µl de tampão PBS e inoculados no coxim plantar da pata direita do camundongo; a pata esquerda recebeu 50 µl de PBS como controle. O volume de pata foi avaliado com um Pleistómetro (Modelo 7140 Plethysmometer Ugo Basile, E.U.A.), imediatamente antes da injeção (basal) e após intervalos de tempo (0.5, 1, 3, 6, e 24 h). A atividade edematogênica foi expressa como porcentagem do aumento de volume da pata direita em comparação à pata esquerda (controle).

### **3.14.4 Quantificação de Interleucina 6 (IL-6)**

Grupos de 5 camundongos (Swiss 18–20 g) receberam uma injeção de veneno total de *P. hyoprora* e da toxina PhTX-I no músculo tibial anterior direito. A dose inoculada foi de 10 µg em um volume de 50 µl. Um grupo controle recebeu 50 µl de solução salina. Após a aplicação das toxinas, em intervalos de tempo (1, 3, 6 e 9 horas), amostras de sangue foram coletadas da cauda em capilares heparinizados e o plasma removido para a determinação dos níveis plasmáticos de interleucina 6 (IL-6). Brevemente, uma micro-placa de 96 poços foi carregada com 100 µL do primeiro anticorpo monoclonal anti-IL-6 e incubado por duas horas a 37 °C. Foram registradas absorbâncias a 450 nm e concentrações de IL-6 foram estimadas a partir de uma curva preparada com IL-6 recombinante.

### 3.14.5 Atividade citotóxica sobre cultura celular de mioblastos e miotubos.

As linhagens celulares utilizadas no estudo foram células de mioblastos murinos C2C12 (ATCC CRL-1772) as quais podem fundir-se e diferenciar-se em miotubos. A cultura celular C2C12 cresceu em um meio DMEN (Sigma D-5796) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FCS; Sigma F-2442), glutamina 2 mM, ácido pirúvico 1 mM, penicilina (100 U/ml) estreptomicina (0,1 mg/ml) e anfotericina B (0,25 µg/ml) em uma atmosfera umidificada com CO<sub>2</sub> 7 % a 37 °C.

Células foram recolhidas a partir de monocamadas subconfluentes em crescimento as quais foram mantidas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>. A separação foi feita tratando a cultura com tripsina (1500 U/mL), contendo EDTA 5,3 mM por 5 min a 37 °C. As células re-suspendidas foram semeadas em uma micro-placa de 96 poços a uma densidade aproximada de 1-4x10<sup>4</sup> células/poço, no mesmo meio de cultura. Após atingir uma confluência similar o meio de crescimento foi mudado para um meio de diferenciação, o qual consiste de meio DMEM suplementado com 1% de soro fetal bovino (Ebisui *et al.*, 1995). Após 4-6 dias de cultura, quando uma vasta proporção de miotubos grandes multinucleados foi observada, a cultura celular foi utilizada nos ensaios de citotoxicidade.

Para medir a atividade citotóxica uma micro-placa de 96 poços foi utilizada como desenho experimental, escolhendo-se um n de 3, correspondente a 3 poços previamente preenchidos com uma cultura celular de mioblastos C2C12, em um meio DMEN com 10 % de soro fetal bovino a 37 °C e CO<sub>2</sub> 7 % (50 µL) previamente incubado em uma estufa de cultura celular.

A citotoxicidade foi determinada seguindo a metodologia descrita por Lomonte *et al.*, (1999). O veneno total de *P. hyoprora* e a toxina PhTX-I previamente dissolvidos no meio de ensaio da cultura celular, contendo as seguintes concentrações: 5, 10, 20 e 40 µg foram acrescentadas no meio de cultura celular em um volume total de 150 µl/poço. Consideram-se dois tipos de controles: positivo em presença de Triton X-100 (+) e negativo só na presença de meio de cultura de DMEN contendo soro fetal bovino a 1 % (-), a fim de poder estabelecer parâmetros percentuais (%) de 0 a 100 % de quantificação de lactato desidrogenase (LDH).

Depois de 3 horas, retirou-se, de cada poço, 100 µl do sobrenadante, sendo estimada a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH), liberada como resultado da lise celular por ação da toxina. O meio de reação conteve 1 ml do substrato preparado de acordo com o indicado pelo kit do fabricante (LDH-P UV Método UV otimizado SFBC Lab. Wiener), previamente

incubado por dois minutos a 30 °C. Logo se acrescentou 80 µL do sobrenadante, depois incubado por 3 minutos aproximadamente e, em seguida, leu-se a absorbância a 340 nm. Posteriormente ao valor obtido como negativo, transformou-se em simples positivo e multiplicou-se por 1000. O valor obtido foi convertido em valor porcentual (%), em relação ao controle positivo máximo encontrado com o Triton X-100.

#### **3.14.6 Atividade citotóxica sobre cultura celular NG97 e NCIH-3T3.**

A atividade citotóxica também foi avaliada nas linhagens celulares NG97 e NCIH-3T3, as quais foram mantidas em frascos plásticos (25cm<sup>2</sup>) com meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), suplementado com L-glutamina 2 %, gamicina 120 µg/mL e soro fetal bovino inativado 13 % (meio completo). As culturas foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado a cada 48 h e quando a cultura atingiu confluência, a subcultura foi realizada por tratamento com tripsina e versene (Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil). Quantidades variáveis das toxinas PLA<sub>2</sub> ou seus derivados modificados quimicamente foram diluídos no meio de ensaio e adicionados às células em placas de 96 poços. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método do vermelho neutro, realizados segundo a metodologia descrita por Borenfreund e Borrero (1984). Após incubação de 4 h com meio isento de soro contendo 50 µg de vermelho neutro/ml, as células foram lavadas rapidamente com PBS e em seguida 0,1 ml de uma solução de ácido acético 1 % (v/v):etanol 50 % (v/v), foi adicionado a cada poço para extrair o corante. Após agitação durante 10 minutos em um agitador de placa de microtitulação a absorbância foi lida a 540 nm. A viabilidade celular foi determinada em comparação com a DO obtida a partir de células não tratadas.

#### **3.15 Análise Estatística.**

Os resultados são reportados como a média ± erro padrão. A significância foi obtida através do teste Anova, quando vários grupos experimentais são comparados entre eles e com o grupo controle. O limite de confiança é de  $p < 0,05$ .

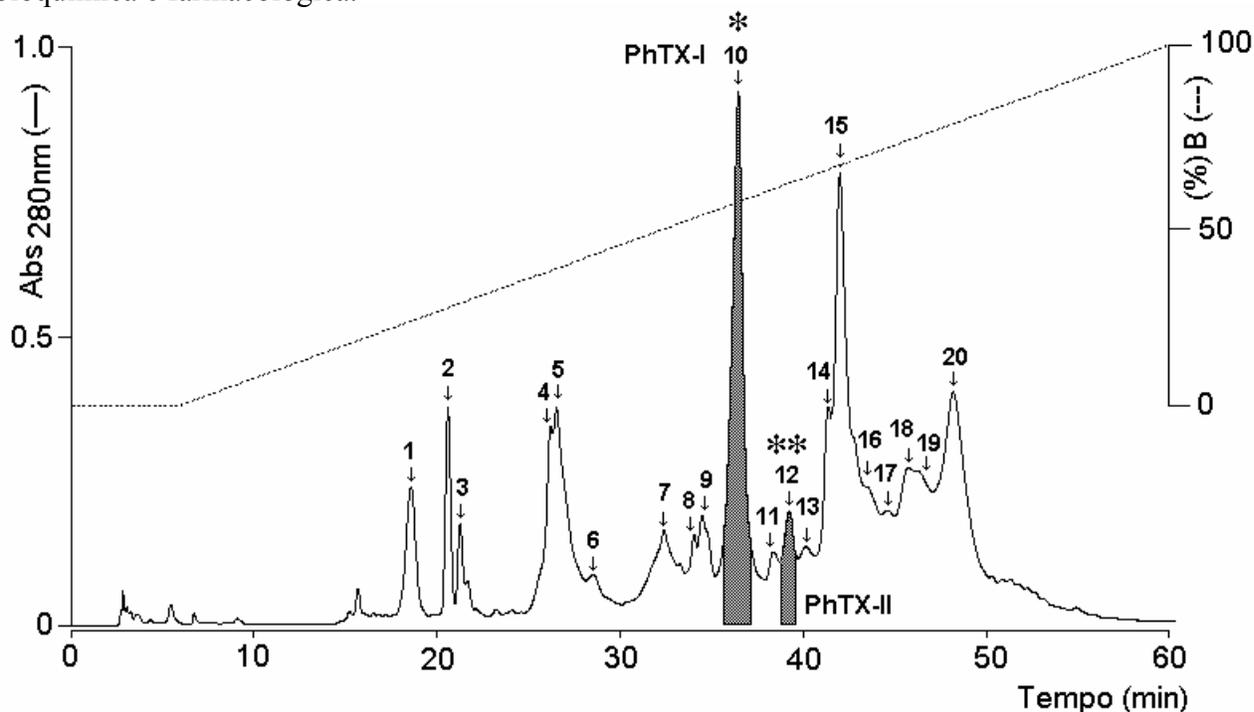
## 4. RESULTADOS.

### 4.1 Purificação e caracterização bioquímica das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.

#### 4.1.1 Purificação das frações PhTX-I e PhTX-II a partir do veneno total de *P. hyoprora*.

O veneno total foi submetido a uma etapa cromatográfica em HPLC de fase reversa, a corrida foi realizada em uma coluna analítica  $\mu$ -Bondapak C18 (3,9 x 300 mm Waters), acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa, com os picos obtidos é possível o monitoramento do perfil de atividades biológicas como miotoxicidade e bloqueio neuromuscular, assim como a atividade enzimática PLA<sub>2</sub>.

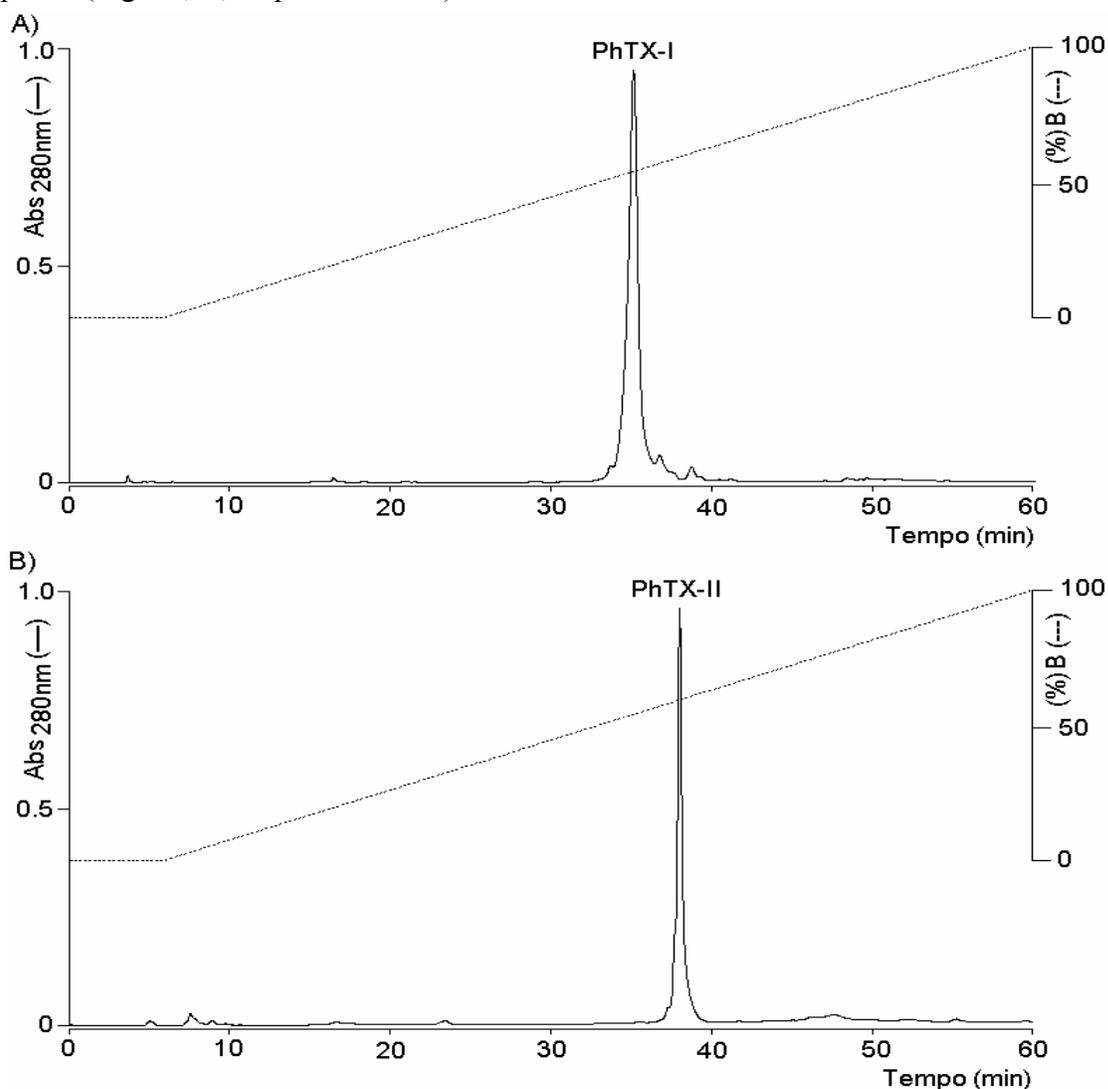
O fracionamento do veneno total resultou em 20 picos (Fig. 6), dos quais os de números 10, 12 e 15 induzem miotoxicidade local em concentrações de 5 a 20  $\mu$ g em músculo gastrocnêmio de camundongo. Adicionalmente, os picos 10 e 12 foram capazes de produzir bloqueio neuromuscular na preparação *biventer cervicis* de pintainho e evidenciaram alta atividade enzimática PLA<sub>2</sub> (14,5 e 12,5 nmoles/min/mg, respectivamente). Este picos denominados PhTX-I e PhTX-II, respectivamente, foram selecionados para sua caracterização bioquímica e farmacológica.



**Figura 6.** Perfil cromatográfico do veneno total de *P. hyoprora* em HPLC de fase reversa usando uma coluna  $\mu$ -Bondapak C18 (3,9 x 300 mm, Waters). A eluição das amostras foi realizada usando-se uma gradiente linear contínua (0-100 %) de concentração do tampão B. O fluxo foi mantido constante a 1 ml/min e monitorado a 280 nm. Frações PhTX-I (\*) e PhTX-II (\*\*) indicadas pelas áreas sombreadas.

#### 4.1.2 Determinação do grau de pureza, recuperação e atividade específica das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.

Com a finalidade de verificar o grau de pureza, as frações correspondentes às PLA<sub>2</sub> PhTX-I e II obtidas anteriormente, em um único passo cromatográfico, foram repurificadas em um sistema de HPLC utilizando as mesmas condições de purificação descritas anteriormente. O perfil cromatográfico mostra a presença de apenas um pico protéico, para ambas as frações, evidenciando alto grau de pureza, conforme mostrado na figura 7. As frações PhTX-I e II foram eluídas aos  $35,5 \pm 1,1$  e  $38,8 \pm 0,8$  minutos, em concentração de  $53,5 \pm 0,3$  % e  $55,3 \pm 0,2$  % de tampão B (Fig 7A, B, respectivamente).



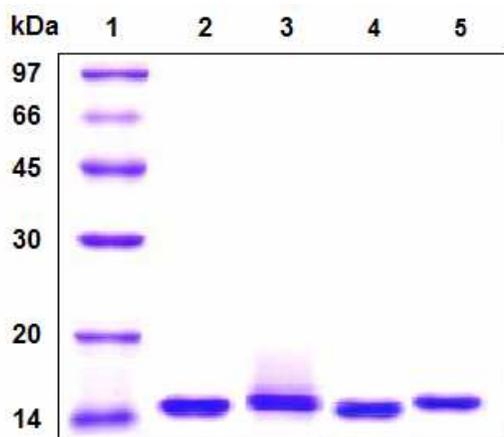
**Figura 7.** Re-cromatografia das frações PhTX-I (A) e PhTX-II (B) em HPLC de fase reversa usando uma coluna  $\mu$ -Bondapak C18 (3,9 x 300 mm, Waters). A eluição foi realizada usando-se uma gradiente linear contínua (0-100 %) de concentração do tampão B. Fluxo constante a 1 ml/min e monitorado a 280 nm.

As frações PhTX-I e II foram purificadas 1361,7 e 679,1 vezes, com rendimento de 13,39 e 4,08%, respectivamente, em relação ao veneno total. A Tabela 3 exibe um resumo das etapas do processo de purificação, assim como o cálculo da atividade específica e a recuperação.

**Tabela 3** Tabela de recuperação e cálculo de atividade específica das frações PhTX-I e II isoladas a partir do veneno de *P. hyoprora*.

Etapa	Vol. (ml)	Proteína (mg/ml)	Atividade (U/ml)	Atividade total (U.T)	Atividade específica (U/mg)	Recup. (%)	Purif. (vezes)
Veneno total (VT)	20	0,9154	274,5	5490	299,87	100	1
HPLC-FR (PhTX-I)	1	0,0018	735	735	408333,33	13,39	1361,71
HPLC-FR (PhTX-II)	1	0,0011	224	224	203636,36	4,08	679,08

A figura 8 mostra os perfis de massa molecular em SDS PAGE, das frações PhTX-I e II (10 µg) em condições nativas e reduzidas com DTT. Nas duas condições, tanto a PhTX-I (pistas 2 e 3) como a PhTX-II (pistas 4 e 5) mostram a presença de uma única banda eletroforética com massa molecular relativa em torno de 15 kDa em relação aos marcadores de massa molecular (pista 1), além de confirmar o alto grau de homogeneidade das frações proteicas.



**Figura 8.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %) SDS-PAGE, corado com comassie blue. Pista 1: marcadores de massa molecular (Mm); Pista 2: PhTX-I nativa; Pista 3: PhTX-I (r) reduzida com DTT; Pista 4: PhTX-II nativa; Pista 5: PhTX-II (r) reduzida com DTT.

#### 4.1.3 Análise de composição de aminoácidos das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.

As PLA<sub>2</sub> PhTX-I e II apresentaram 125 e 121 resíduos de aminoácidos, respectivamente (tabela 4), com presença de 14 resíduos de cisteínas em ambas proteínas, o que evidencia a presença de 7 pontes dissulfeto intracadeia, característica molecular desta família de proteínas.

PhTX-I e II apresentam alto conteúdo dos aminoácidos Lys, Tyr, Gly e Cys típicos das PLA<sub>2</sub> básicas. O ponto isoelétrico teórico é de 8.4 e 7.35, respectivamente. A massa molecular calculada baseada na análise de composição de aminoácidos é 14088,57 Da para a PhTX-I e 13511.07 Da para a PhTX-II.

**Tabela 4.** Composição de aminoácidos das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II isoladas do veneno de *P. hyoprora*. Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteína. (ND) não determinado.

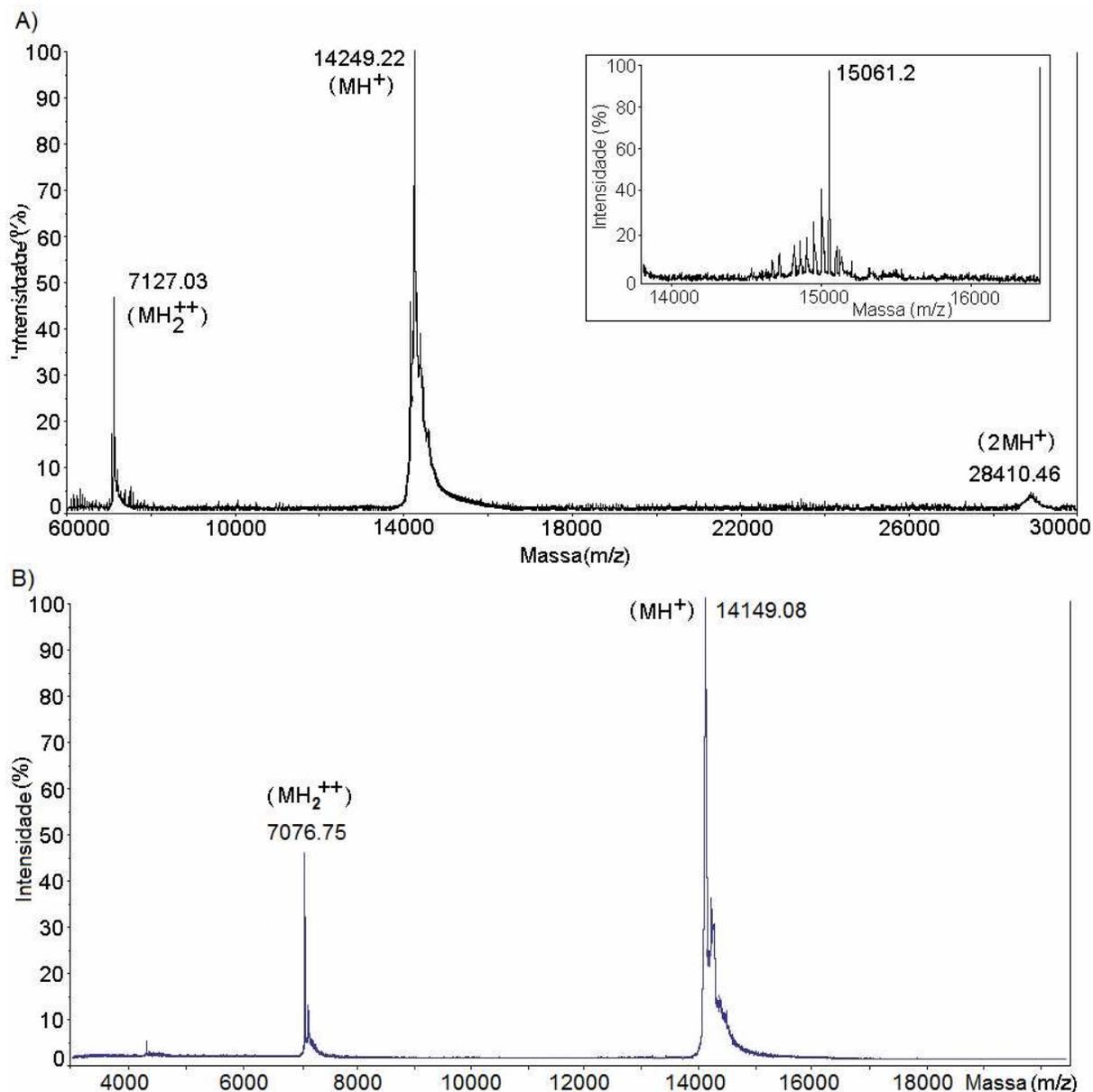
AA	PhTX-I			PhTX-II		
	%	Massa	Número	%	Massa	Número
Asp	8,99	1266,21	11	9,09	1266,21	11
Glu	8,25	1162,17	9	9,09	1420,43	11
Ser	4,33	609,63	7	4,13	435,45	5
Gly	4,46	627,77	11	9,09	627,77	11
His	2,92	411,48	3	1,65	274,32	2
Arg	11,09	1562,1	10	5,79	1093,47	7
Thr	7,1	1000,08	9	4,96	666,72	6
Ala	2,52	355,45	5	4,96	426,54	6
Pro	2,76	388,52	4	3,31	388,52	4
Tyr	8,91	1255,65	11	8,26	1141,5	10
Val	4,63	652,6	4	1,65	326,3	2
Met	2,79	393,63	3	1,65	262,42	2
Cys	10,6	1493,96	14	11,57	1443,96	14
Ile	3,66	515,85	5	4,96	619,02	6
Leu	5,62	792,19	7	4,96	679,02	6
Phe	5,22	735,95	5	4,96	883,14	6
Lys	6,37	897,33	7	9,92	1538,28	12
Trp			ND			ND
Total	100	14088,57	125	100	13511.07	121

#### 4.1.4 Determinação da massa molecular por Espectrometria de Massas (Maldi-Tof).

A análise de PhTX-I e II por espectrometria de massas Maldi-tof confirmou a homogeneidade das proteínas e determinou os seus valores de massa molecular exata. A massa da PhTX-I foi de 14249,22 Da, como mostrado na figura 9A onde se apresenta o espectro da PhTX-I com os valores de massa ( $m/z$ ) da proteína ionizada ( $MH^+$ ), assim como rastros de íons moleculares duplamente carregados ( $MH^{2+}$ ), aproximadamente na metade do valor  $m/z$  e rastros de espécies diméricas ( $2MH^+$ ), aproximadamente duas vezes o valor de  $m/z$ . A massa da PhTX-I

após ser reduzida e alquilada foi de 15061.2 Da (inserto na figura 9A). O aumento de massa de 812 Da indica a presença de 14 resíduos modificados de Cys-CAM.

A figura 9B mostra o espectro da PhTX-II com os valores de massa ( $m/z$ ) da proteína ionizada ( $MH^+$ ), assim como rastros de íons moleculares duplamente carregados ( $MH_2^{2+}$ ). A massa da PhTX-II foi de 14149.08 Da.



**Figura 9.** Determinação da massa molecular das PLA<sub>2</sub> PhTX-I (A) e PhTX-II (B) por espectrometria de massas MALDI-TOF. Os íons moleculares  $MH^+$ ,  $MH_2^{2+}$  e  $2MH^+$  são mostrados no espectro. Inserto na figura A: espectro de massa MALDI-TOF da PLA<sub>2</sub> PhTX-I reduzida e alquilada mostrando os múltiplos canais de alquilação.

#### 4.1.5 Caracterização da estrutura primária da PLA<sub>2</sub> PhTX-I.

A PLA<sub>2</sub> PhTX-I foi digerida com tripsina bovina e os peptídeos trípticos resultantes foram separados em HPLC de fase reversa. Foram obtidos 18 picos (dados não mostrados), cada pico foi coletado manualmente e liofilizado. O sequenciamento “de novo” de cada peptídeo foi feito por espectrometria de massas em tándem ESI-Q-TOF/MS/MS. Os dados obtidos foram processados usando o software Mascot MS/MS Ion Search ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). A tabela 5 mostra as massas medidas e a sequência deduzida de cada um dos peptídeos obtidos a partir da clivagem tríptica da PLA<sub>2</sub> PhTX-I.

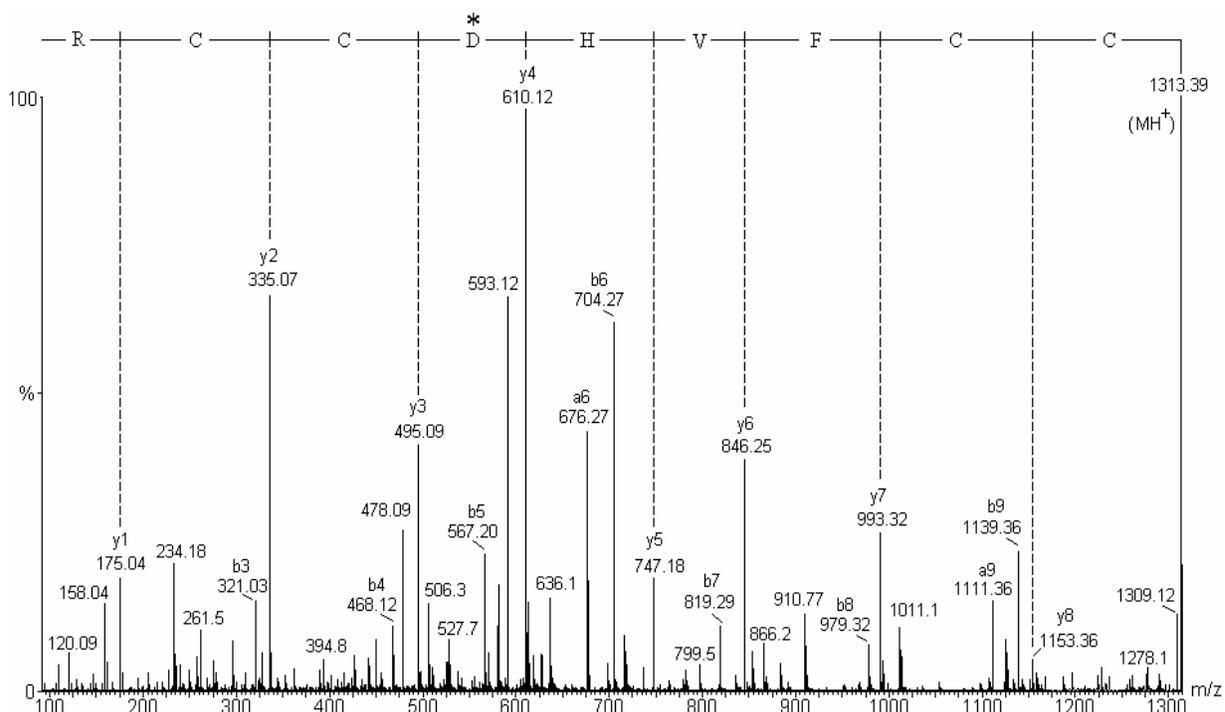
**Tabela 5.** Massas moleculares e sequências de aminoácidos obtidas por espectrometria de massas ESI-MS/MS dos peptídeos trípticos de PhTX-I. Os peptídeos foram separados por HPLC de fase reversa. C = cisteína alquilada, Os resíduos de lisina mostrados em negrito foram deduzidos da clivagem pela tripsina. Todas as massas moleculares são reportadas como monoisotópicas.

Fração HPLC	Massa medida (Da)	Sequência de aminoácidos
1	1312.38	ENI/LGTYNK/QK/QYR
2	1547.52	GAYGCYCGWGGR <b>GK</b>
3	1763.75	DPCK/QEI/LCECDK/QAAAV
4	503.18	MI/LI/L <b>K</b>
5	2102.91	KI/LTGCPK/QTNDRYSYSW <b>K</b>
6	671.28	GK/QPK/QD <b>K</b>
7	918.39	MI/LI/LK/QETG <b>K</b>
8	1384.54	CCFVHDCCR
9	2042.64	DK/QTDDRCCFVHDCCR
10	797.19	NPFYY
11	1840.82	AAAVCFRENI/LGTYNK/Q <b>K</b>
12	884.41	GRGK/QPK/QD <b>K</b>
13	1204.55	SI/LCK/QK/QADK/QPC
14	893.32	DI/LWEFG <b>K</b>
15	1883.76	ETGK/QNPFYYGAYGCY
16	1650.77	K/QYRYHI/LRSI/LCK/Q <b>K</b>
17	1160.44	I/LTGCPK/QTNDR
18	2793.06	TNDRYSYSWK/QDI/LTI/LVCGEDDP <b>K</b>

Não foram discriminados os resíduos de lisina e isoleucina em nenhuma das sequências reportadas devido a que não são distinguíveis no espectro CID (dissociação induzida por colisão) de baixa energia. Devido à calibração externa aplicada a todos os espectros não foi possível resolver a diferença de 0,036 Da entre resíduos de glutamina e lisina, exceto para as lisinas que

foram deduzidas em base à clivagem da tripsina (Tripsina cliva no extremo carboxi terminal de lisina ou arginina). Cada peptídeo sequenciado “de novo” foi submetido à base de dados NCBI usando o programa BLAST-p protein search com uma procura restrita a proteínas básicas com atividade fosfolipase A<sub>2</sub>.

O espectro de massa contendo a série de íons *y* do peptídeo eluído na fração 8 do HPLC de fase reversa é mostrado na figura 10. O peptídeo tem a sequência C C F V H D C C R, contendo um resíduo de ácido aspártico que corresponde à posição 49 na sequência completa de aminoácidos, portanto, nos permite classificar a PhTX-I como parte da família das PLA<sub>2</sub> D49.



**Figura 10.** Espectro ESI-QTOF-MS/MS do peptídeo triptico de 1312.38 Da. Séries de íons *y* do peptídeo (contendo 9 resíduos de aminoácidos) eluído no pico 8 do HPLC de fase reversa da PhTX-I alquilada e contendo um resíduo de ácido aspártico que corresponde à posição 49 na sequência completa de aminoácidos.

O resultado da análise da estrutura primária mostra que a PhTX-I está composta de 123 resíduos de aminoácidos, compartilhando as sequências conservadas de domínios comuns ao grupo das PLA<sub>2</sub> D49, incluindo as 14 cisteínas, a alça de ligação ao cálcio localizada em (Y)27, (G)29, (G)31, (G)32, o sítio catalítico formado por (H)48, (D)49, (Y)52 e (D)89. PhTX-I revela a mudança de alguns aminoácidos importantes como: (S)1→(D)1; (Q)4→(E)4; (Q)7→(K)7; (R)34→(G)34; (R)70→(W)70; I(86)→(L)86; (D)118→(A)118 em relação ao consenso.

Comparação da sequência da PhTX-I mostra homologia entre 44% a 90% (em caixa), com outras PLA<sub>2</sub> D49 miotóxicas pertencentes à família Viperidae (Fig. 11). Os traços (-) correspondem aos gerados pelo software usado no alinhamento. As posições dos resíduos de cisteína se encontram em posições idênticas com as outras PLA<sub>2</sub>, pelo que se trata de proteínas muito relacionadas, mantendo os mesmos motivos estruturais.

	10	20	30	40	
PhTX_I	D L W E F G K M I L K E T G K N P F P Y Y G A Y G C Y C G W G G R G	-	K P K D K T D D		
6_1	D L F E W G Q M I L K E T G K N P F P Y Y G A Y G C Y C G W G G R G	-	K P K D K T D D		
BbTXIII	S L W E W G Q M I L K E T G K N P F P Y Y G A Y G C Y C G W G G R R	-	K P K D A T D		
6_2	D L W Q F G Q M I L K E T G K I P F P Y Y G A Y G C Y C G W G G R G	G	K P K D - G T D		
BmjeTX_I	D L W Q F G Q M I L K E T G K I P F P Y Y G A Y G C Y C G W G G R G	G	K P K A - G T D		
BmjeTX_II	D L W Q F G Q M I L K E T G K I P F S Y Y G A Y G C Y C G W G G R G	G	K P K A - G T D		
BmTX_I	D L W Q F N K M I K K E V G K L P F P F Y G A Y G C Y C G W G G R G	E	K P K D - G T D		
LmTX_I	H L L K F N K M I K F E T R K N A I P F Y A F Y G C Y C G W G G R X	-	X X X X - X X X		

	* 50	60	70	80	
PhTX_I	R C C F V H D C C R Y K K L T G C P K T N D R Y S Y S W K D L T I V C G E D D P C K E				
6_1	R C C Y V H D C C - Y K K L T G C P K T D D R Y S Y S W L D L T I V C G E D D P C K E				
BbTXIII	R C C F V H D C C R Y K K L T G C P K T N D R Y S Y S R L D Y T I V C G E D D P C K E				
6_2	R C C Y V H D C C - Y K K L T G C P K T D D R Y S Y S W L D L T I V C G E D D P C K E				
BmjeTX_I	R C C Y V H D C C - Y G K L T S C P K T D D R Y S Y S W L D G T I V C G E D D P C K E				
BmjeTX_II	R C C Y V H D C C - Y G K L T S C P K T D D R Y S Y S R L D L T I V C G E D D P C K E				
BmTX_I	R C C F V H D C C - Y K K L T G C P K W D D R Y S Y S W K D I T I V C G E D L P C E E				
LmTX_I	X C C F V H D C C - Y G K X X X X X X X W D L Y R Y S L K S G Y L T C G K G T W C E E				

	90	100	110	120	%	Identidade
PhTX_I	- L C E C D K A A A V C F R E N L G T Y N K K Y R Y H L R S L C K K A D K P C				100.0	123
6_1	- L C E C D K A I A V C F R E N L G T Y N K K Y R Y H L K P - C K K A D K P C				90.9	121
BbTXIII	- I C E C D K A A A V C F R E N L R T Y N K K Y M A H L R V L C K K - D K P C				89.3	121
6_2	- L C E C D K A I A V C F R E N L G T Y N K K Y R Y H L K P - C K K A D K P C				86.8	121
BmjeTX_I	- L C E C D K K I A V C F R E N L G T Y N K K Y R Y H L K S - C K K A D K P C				84.3	121
BmjeTX_II	- L C E C D K K I A V C F R E N L G T Y N K K Y R Y H L K S - C K K A D K P C				82.6	121
BmTX_I	- I C E C D R A A A V C F Y E N L G T Y N K K Y M K H L K P - C K K A D Y P C				78.5	121
LmTX_I	Q I C E C D R V A A E C L R R S L S T Y K Y G Y M F Y P D S R C R G P S E T C				44.3	122

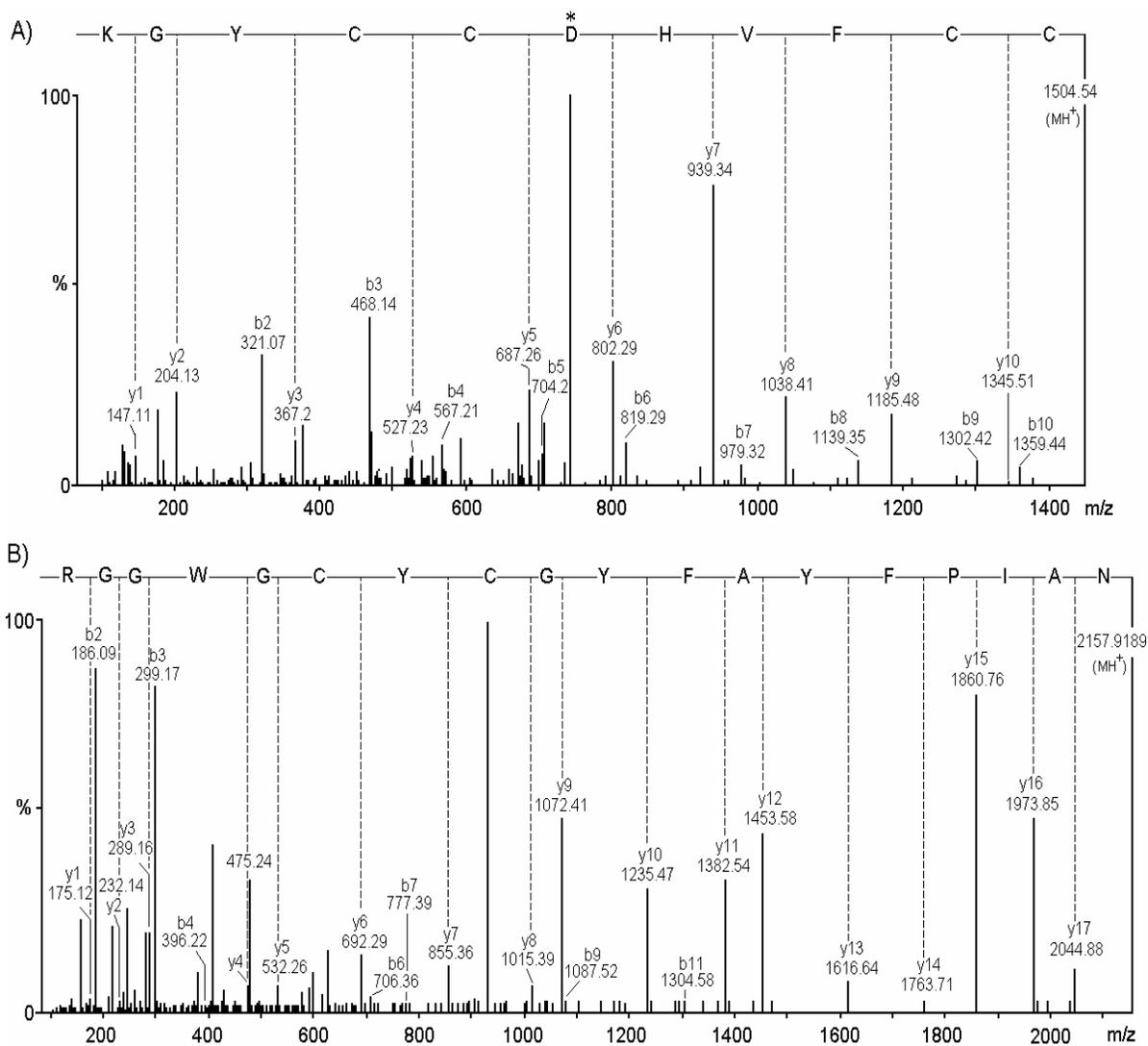
**Figura 11.** Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da PLA<sub>2</sub> PhTX-I com outras PLA<sub>2</sub> D49 da família Viperidae. BbTX-III (Brazilitoxin III) de *B. brazili* (Huanchuire-Vega *et al.*, 2009); 6\_1 e 6\_2 de *B. jararacussu* (Ponce-Soto *et al.*, 2006); BmTX-I de *B. moojeni* (Calgarotto *et al.*, 2008); BmjeTX-I e BmjeTX-II de *B. marajoensis* (Ponce-Soto *et al.*, 2010); LmTX-I de *L. m. muta* (Damico *et al.*, 2005).

#### 4.1.6 Caracterização da estrutura primária da PLA<sub>2</sub> PhTX-II.

A proteína PhTX-II também foi digerida com tripsina bovina e os peptídeos trípticos resultantes foram sequenciados por espectrometria de massas em tándem ESI-Q-TOF/MS/MS. A tabela 6 mostra a massa observada dos peptídeos trípticos, a massa esperada e a massa calculada, assim como a sequência de aminoácidos de cada peptídeo obtido de PhTX-II e sua posição na sequência primária da proteína. Os espectros de massa contendo a série de íons  $y$  do terceiro e quarto peptídeos, e as sequências de aminoácidos nas posições 16 - 33 e 43 - 53, respectivamente, são mostrados na figura 12. O quarto peptídeo (Fig. 12A) tem a sequência C C F V H D C C Y G K mostrando um resíduo de Asp na posição 49 da estrutura primária da proteína, sugerindo que esta proteína também pertence à família das PLA<sub>2</sub> D49, cataliticamente ativas.

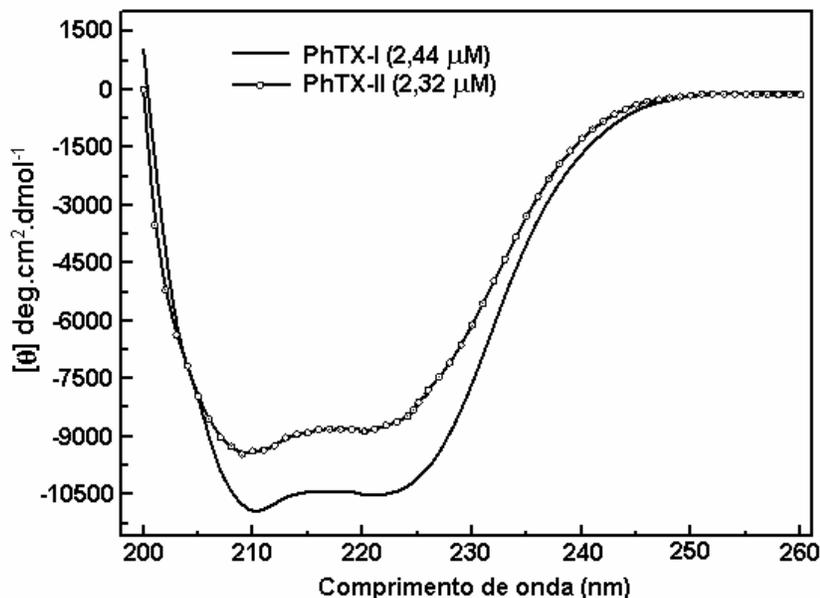
**Tabela 6.** Sequência de aminoácidos dos peptídeos obtidos por hidrólise triptica a partir da PLA<sub>2</sub> PhTX-II

Início	Final	Observada	Mr (expt)	Mr (cal)	Delta	Sequencia de aminoácidos
1	7	438,7318	875,4491	875,4865	-0,0374	NLLQFNK(M)
8	15	468,2504	934,4862	934,5157	-0,0295	(K)MILKETGK(N) <sup>a</sup>
16	33	1079,9679	2157,9212	2157,9189	0,0023	(K)NAIPFYAFYGCYCGWGGR(G)
43	53	753,2472	1504,4798	1504,5356	-0,0559	(R)CCFVHDCCYGK(L)
61	69	592,8006	1183,5866	1183,5913	-0,0047	(K)WDIYPYSLK(S)
70	77	443,1818	884,349	884,4062	-0,0572	(K)SGYITCGK(G)
78	90	871,8063	1741,5981	1741,6494	-0,0514	(K)GTWCEEQICECDR(A)
91	97	404,7131	807,4116	807,4061	0,0055	(R)AAICFR(E)
98	105	498,7416	995,4686	995,456	0,0126	(R)ENLDTYNK(Y)
106	115	649,7614	1297,5083	1297,5437	-0,0355	(K)YGYMFYPDSR(C)
116	123	483,1726	964,3306	964,3743	-0,0436	(R)CKGPSEQC-

**Figura 12.** Espectro ESI-QTOF-MS/MS mostrando as séries de íons y e as sequências de aminoácidos do quarto peptídeo (A) (posições 43 - 53) e do terceiro peptídeo (B) (posições 16 - 34).



não mostrados) para ambas proteínas, indicando alto conteúdo de estrutura  $\alpha$ -hélice. A análise do espectro da PhTX-I nativa mostra conteúdo de  $\alpha$ -hélices, folhas- $\beta$  e dobras- $\beta$  de 31,9%, 17,9% e 17,1%, respectivamente. A análise do espectro da PLA<sub>2</sub> PhTX-II mostra um intervalo de sinal indicativo de porcentagem de hélice- $\alpha$  da ordem de 30,5 %, folhas- $\beta$  de 18,2% e dobras- $\beta$  de 16,9%. Os valores indicativos de porcentagem foram obtidos após deconvolução dos espectros de CD da proteína pelo programa CDNN.



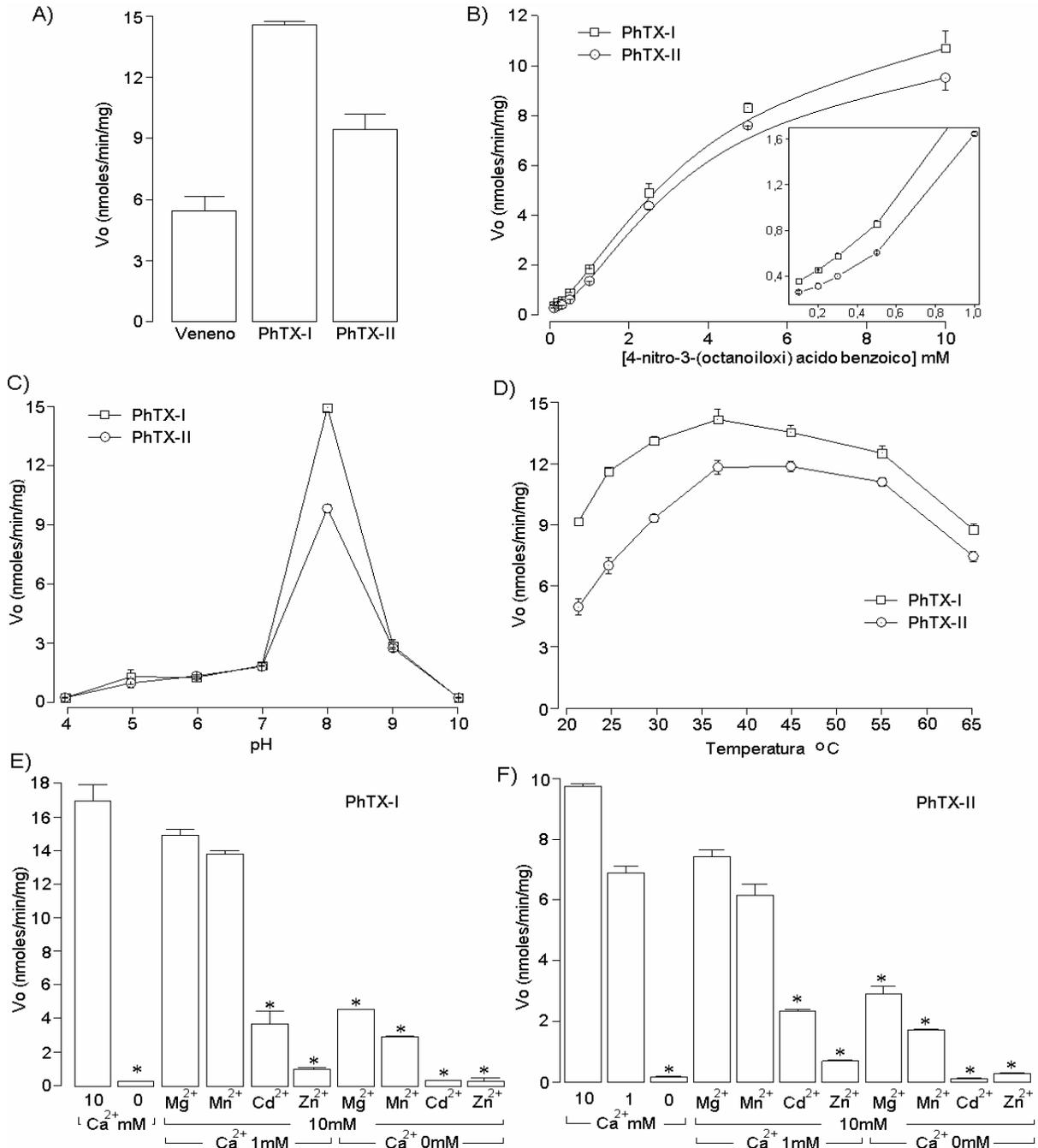
**Figura 14.** Espectros de CD no UV-distante das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II. Medidas de CD realizadas a 25 °C, em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 8.

#### 4.1.8 Estudos da cinética enzimática das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.

A atividade enzimática PLA<sub>2</sub> foi examinada usando o substrato cromogênico NOAB [ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico], seguindo a metodologia de Cho e Kézdy (1991), Holzer e Mackessey (1996) e adaptado para micro-placa por Ponce-Soto *et al* (2006). A atividade PLA<sub>2</sub> é expressa como velocidade inicial de reação ( $V_0$ ). Os valores de atividade para o veneno total e para as PLA<sub>2</sub> PhTX-I e II, na concentração de substrato 10mM, foram  $5,49 \pm 0,71$ ,  $14,7 \pm 0,19$ , e  $9,65 \pm 0,65$  nmoles/min/mg, respectivamente (Fig. 15A).

O efeito da concentração do substrato (NOAB) na atividade PLA<sub>2</sub> de PhTX-I e II apresenta cinética sigmoidal, principalmente em baixas concentrações do substrato, indicativo de um comportamento tipo alostérico (Fig. 15B). Os valores de pH e temperatura ótimos para as duas enzimas foram 8 e 37°C, respectivamente (Figs 15C e D), entretanto, aos 40 e 45 °C PhTX-II ainda mantém uma alta atividade enzimática. Ambas as enzimas mostram completa

dependência de cálcio para exibir sua atividade enzimática ótima, adição de íons  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  (10mM) na ausência de cálcio adicionado ou na presença de baixas concentrações (1mM), diminui significativamente a atividade enzimática tanto da PhTX-I (Fig. 15E) como da PhTX-II (Fig. 15F).



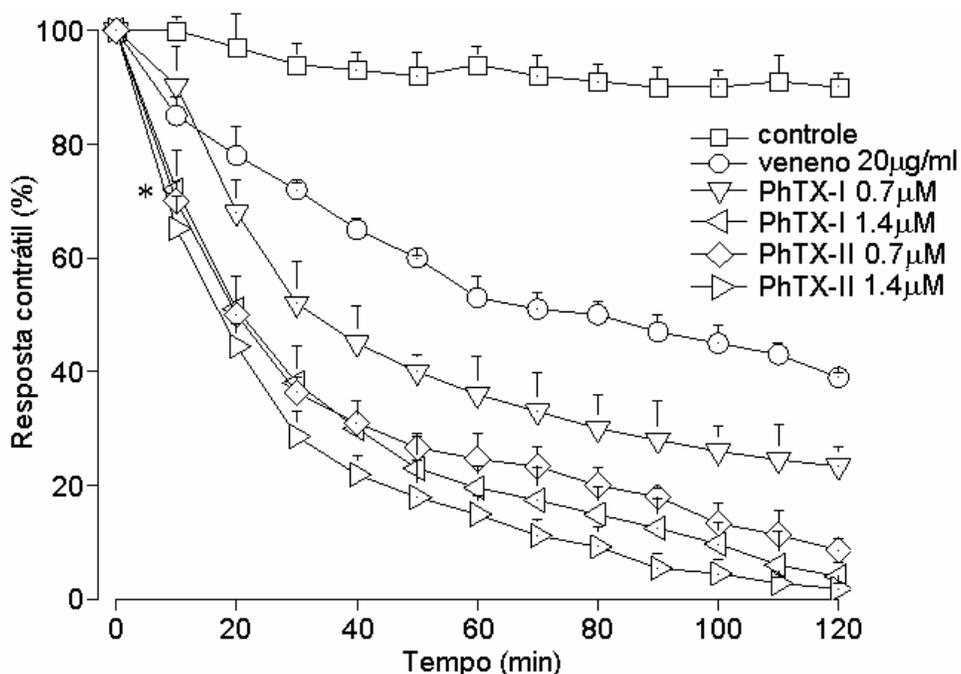
**Figura 15.** (A) Atividade enzimática PLA<sub>2</sub> do veneno total de *P. hyoprora* (VT), e das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II, (B) Efeito da concentração do substrato. Inseto: detalhes em baixas concentrações, (C) Efeito do pH, (D) Efeito da temperatura, (E e F) Efeito dos íons sobre PhTX-I e PhTX-II. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão ( $p < 0.05$ ).

## 4.2 Caracterização farmacológica das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.

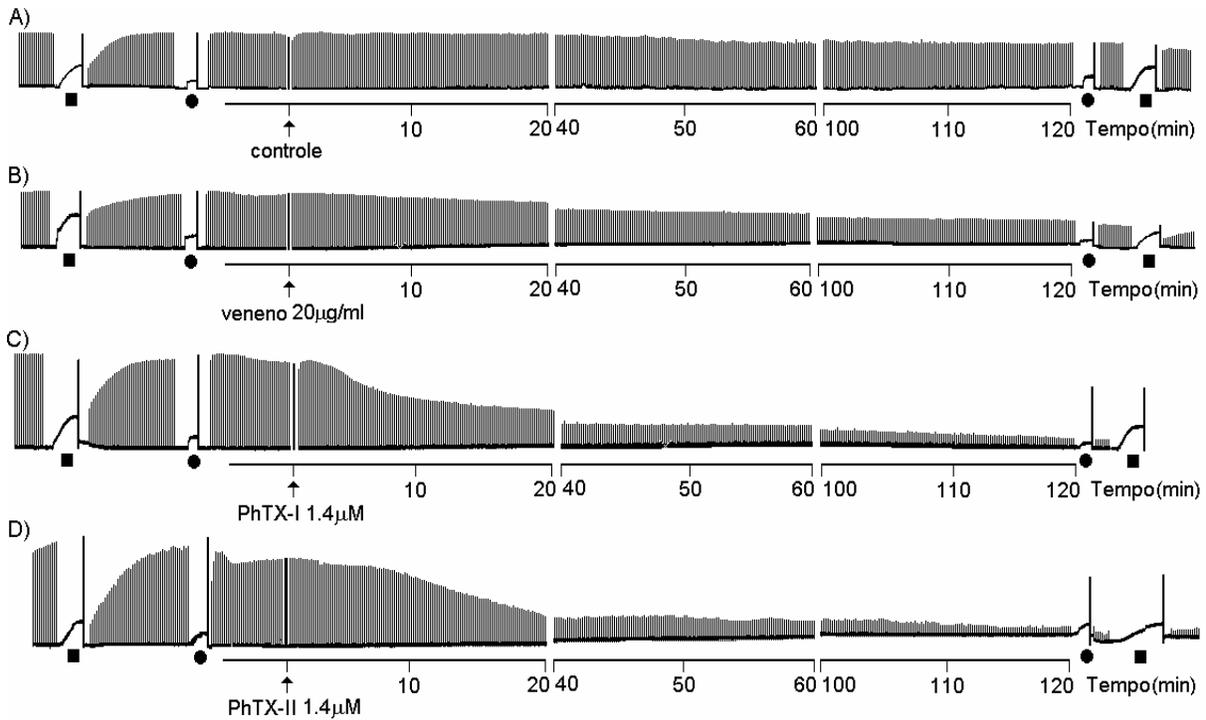
### 4.2.1 Determinação da atividade paralisante neuromuscular *ex vivo* do veneno total e das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.

Para este experimento foram testadas, na preparação neuromuscular *biventer cervicis* de pintainho, concentrações de 20 µg/ml do veneno total de *P. hyoprora* e concentrações finais de 0,7 e 1,4 µM das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e II. As toxinas produziram efeito paralisante neuromuscular sob estímulo elétrico indireto, em todas as concentrações testadas, a 37 °C (Fig. 16). O tempo necessário para obter um bloqueio de 50 % da resposta contrátil do músculo na concentração de 20 µg/ml do veneno total foi de  $81 \pm 5,4$  min. As PLA<sub>2</sub> PhTX-I e II precisaram de  $28 \pm 3,9$  e  $20 \pm 3,1$  min para 0,7 µM e  $19 \pm 2,7$  e  $18 \pm 2,8$  min para 1,4 µM, respectivamente.

Neste modelo de preparação muscular as PLA<sub>2</sub> PhTX-I e II se mostram como bloqueadores da transmissão nervosa na junção neuromuscular, o bloqueio foi irreversível na pós-lavagem em todas as concentrações tal como se mostra no registro miográfico da figura 17, assim como as contraturas em resposta à acetilcolina (ACh) e ao potássio na forma de KCl.

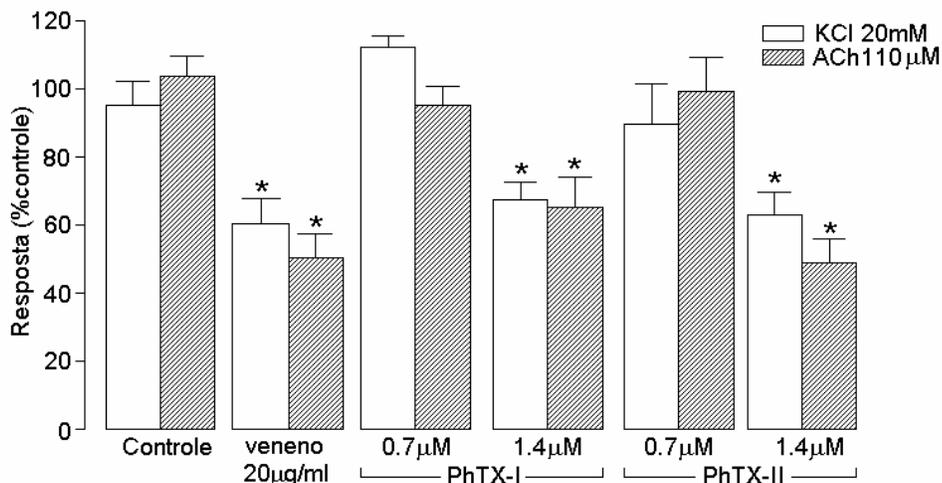


**Figura 16.** Representação gráfica do bloqueio concentração-dependente da resposta contrátil na transmissão neuromuscular, em preparação *biventer cervicis* de pintainho (estímulo indireto), por ação do veneno total de *P. hyoprora*, (20 µg/ml) e por ação das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II nas concentrações finais de 0,7 e 1,4 µM. Cada ponto corresponde à média  $\pm$  erro padrão de 5 experimentos.



**Figura 17.** Registros miográficos da resposta muscular na preparação de *biventer cervicis* de pintainho em presença do controle (A), veneno total 20 µg/ml (B), PLA<sub>2</sub> PhTX-I 1,4 µM (C) e PLA<sub>2</sub> PhTX-II 1,4 µM (D). A contratura em resposta à acetilcolina (ACh 110 µM; ●) e ao KCl (20 mM; ■) foi obtida antes e depois da adição da toxina.

As respostas à ACh exógena (110 µM) e ao KCl (20 mM) foram obtidas antes e após a adição das toxinas. Após 120 min de incubação o veneno (20 µg/ml) alterou significativamente as contraturas induzidas pela ACh (110 µM) e pelo KCl (20 mM), da mesma forma que as PLA<sub>2</sub> PhTX-I e II na concentração de 1,4 µM, por outro lado, em concentrações menores (0,7 µM) ambas PLA<sub>2</sub> não tiveram diferença significativa em relação com o controle (Fig. 18).

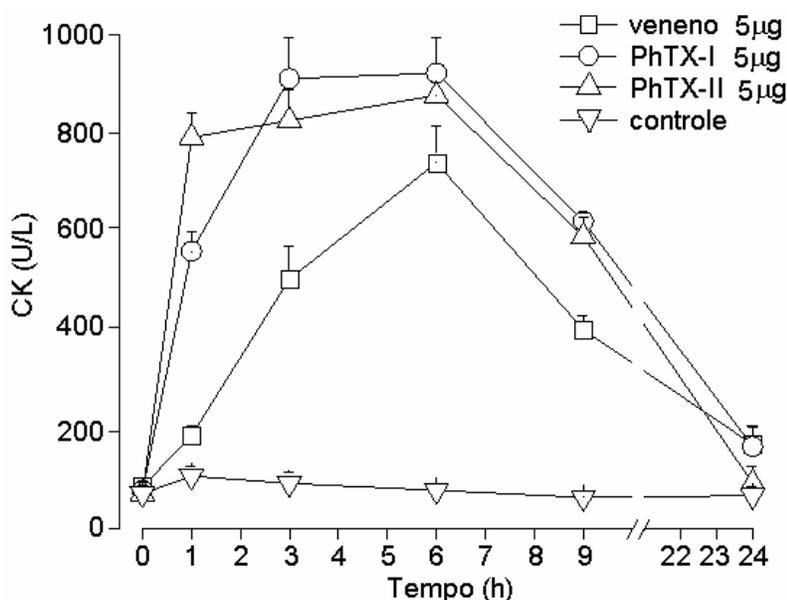


**Figura 18.** Porcentagem de bloqueio da contratura em resposta à acetilcolina (ACh) e ao potássio (KCl), do veneno total (20 µg/ml) e das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II (0,7 e 1,4 µM) (\*p<0,05).

#### 4.2.2 Atividade miotóxica local *in vivo* do veneno total e das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.

Os estudos realizados para determinar *in vivo* o efeito miotóxico local do veneno total e das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II (5 µg) foram feitos em camundongos inoculados com as toxinas por via intramuscular. O dano muscular foi avaliado pelo aumento dos níveis de CK plasmático.

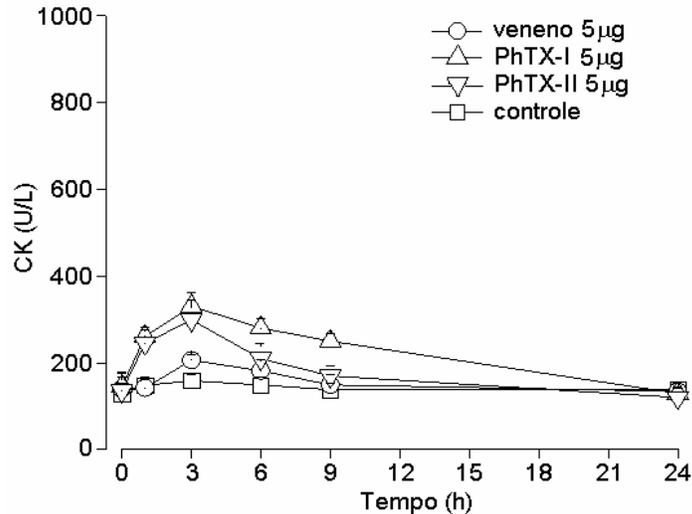
Os resultados mostram que os níveis de CK plasmáticos aumentam drasticamente nas primeiras 3 a 6 horas do tratamento, atingindo até  $720,83 \pm 83,02$ ,  $840,41 \pm 60,23$  e  $934 \pm 45,1$  U/L de CK para o veneno total e as toxinas PhTX-I e PhTX-II, respectivamente. Os níveis de CK plasmático voltaram a níveis normais 9 horas após o início da análise (Fig. 19).



**Figura 19.** Representação gráfica da atividade miotóxica local do veneno total e das toxinas PhTX-I e PhTX-II de *P. hyoprora* inoculados em camundongo. Mostra-se os valores de creatina quinase (CK) plasmática, incrementados ao longo do tempo, após a administração intramuscular do veneno e das toxinas PhTX-I e PhTX-II (5 µg) (n=5).

#### 4.2.3 Atividade miotóxica sistêmica *in vivo* do veneno total e das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.

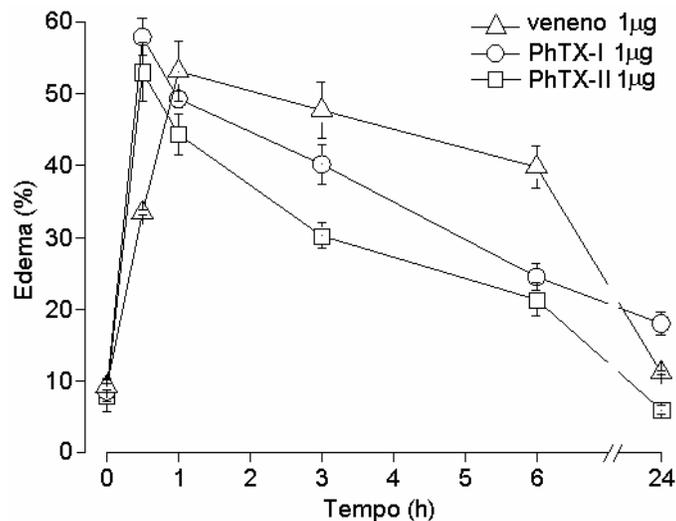
*In vivo*, o veneno total e as PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II de *P. hyoprora* inoculados por via intravenosa não induziram efeito miotóxico sistêmico, já que os níveis de CK plasmático ao longo do tempo não tiveram incremento significativo em relação ao controle, que recebeu PBS (Fig. 20), o máximo valor atingido foi 290 U/L de CK pela PhTX-I 3 horas após a inoculação da toxina (5 µg). Por outro lado, na miotoxicidade local (Fig. 19), as toxinas induziram elevação dos níveis de CK perto das 1000U/L.



**Figura 20.** Representação gráfica da atividade miotóxica sistêmica do veneno e das toxinas PhTX-I e PhTX-II (5 µg) de *P. hyoprora* inoculados em camundongo. Mostram-se os valores de CK plasmático ao longo do tempo, após administração intravenosa (n=5).

#### 4.2.4 Determinação da atividade edematogênica do veneno total e das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.

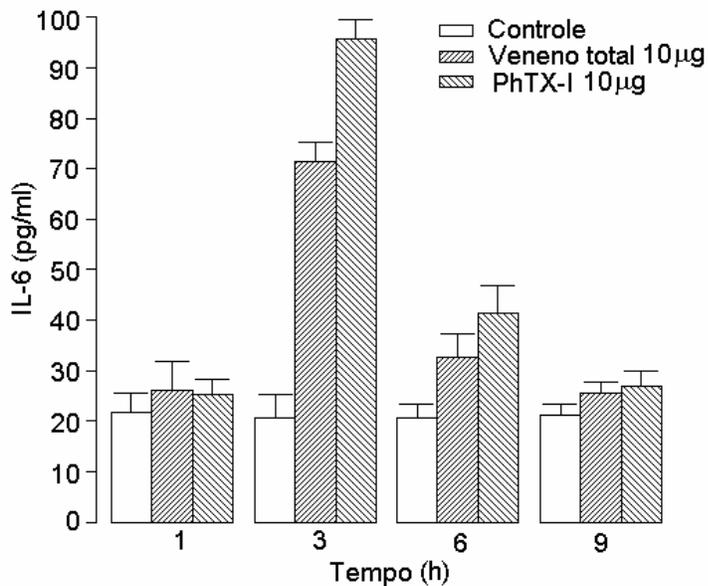
Para o estudo da atividade inflamatória, verificou-se um dos eventos que ocorre neste processo, a formação de edema. Para isto, veneno total e as PLA<sub>2</sub> PhTX-I e II (1 µg) foram dissolvidas em 50 µl de PBS, e aplicadas sob a região intraplantar da pata direita de camundongos. A pata esquerda recebeu 50 µl de PBS como controle. O edema é expresso como o porcentual de aumento em volume da pata direita com relação à pata esquerda. A figura 21 mostra que tanto o veneno total quanto as toxinas PLA<sub>2</sub> induzem edema moderado 30 minutos após iniciado o tratamento.



**Figura 21.** Atividade edematogênica do veneno total e das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II de *P. hyoprora* em camundongos (18-20 g). Cada ponto representa a média ± o desvio-padrão de 5 animais.

#### 4.2.5 Determinação dos níveis de interleucina 6 (IL-6) após injeção intramuscular do veneno total e PhTX-I.

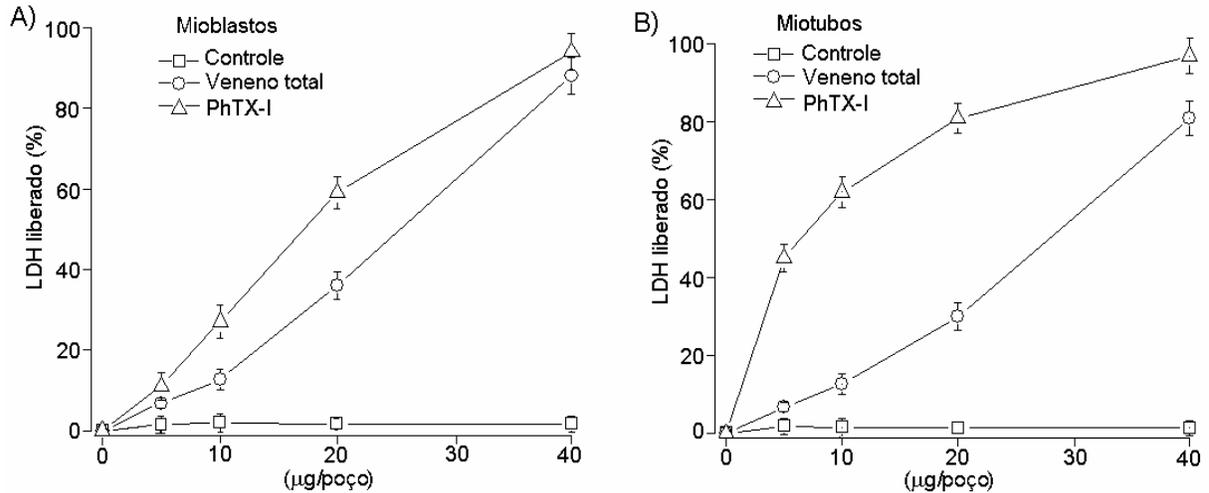
10 µg de veneno total e da PLA<sub>2</sub> PhTX-I foram injetados no musculo tibial anterior direito de camundongos e a concentração de IL-6 no plasma foi medida. Tanto o veneno total assim como a PhTX-I causaram aumento significativo nos níveis plasmáticos de IL-6, quando comparadas ao controle, atingindo o aumento máximo 3 horas após a aplicação ( $71,2 \pm 5,4$  pg/ml e  $96,4 \pm 4,9$  pg/ml para o veneno total e a PhTX-I respectivamente). Seis horas após a injeção a concentração de IL-6 diminui, alcançando os níveis plasmáticos normais após 9 horas (Fig. 22).



**Figura 22.** Níveis de concentração de Interleucina (IL-6) plasmática induzida por 10 µg de veneno total de *P. hyoprora* e da PLA<sub>2</sub> PhTX-I em camundongos. Concentração de IL-6 plasmática foi determinada em diferentes horas após aplicação das toxinas.

#### 4.2.6 Determinação do efeito citotóxico do veneno total e PhTX-I sobre mioblastos e miotubos (C2C12).

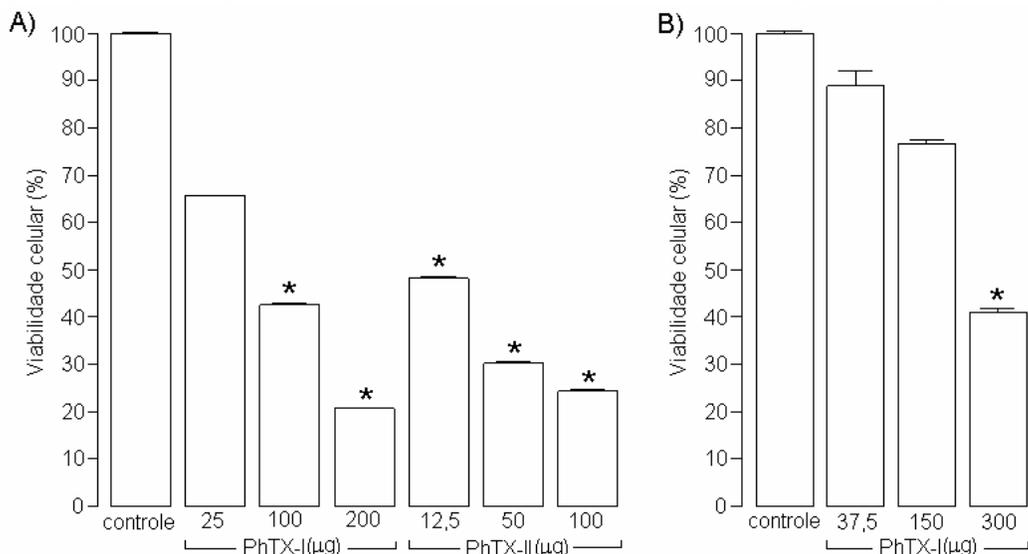
Doses de 5 e 10 µg/150µl do veneno total e da PLA<sub>2</sub> PhTX-I evidenciaram um ligeiro efeito citotóxico quando foram testados em mioblastos C2C12 (Fig. 23A). A toxina PhTX-I foi citotóxica sobre miotubos, com doses a partir de 5 – 40 µg/poço, já o veneno total induz o mesmo efeito com doses de 10 - 40 µg/poço. Esta toxicidade foi evidenciada pelo aumento significativo nos níveis de LDH depois de acrescentada a toxina (Fig. 23B).



**Figura 23.** Atividade citotóxica *in vitro* do veneno total de *P. hyoprora* e PLA<sub>2</sub> PhTX-I sobre cultura celular de mioblastos (A) e miotubos (B). Lise celular foi estimada pela liberação de desidrogenase láctica (LDH) no sobrenadante após 3 horas de exposição à toxina em um volume de 150 µL/poço.

#### 4.2.7 Atividade citotóxica das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II sobre células NIH-3T3 e NG97.

PhTX-I e PhTX-II foram citotóxicas, de maneira dose-dependente, sobre a linhagem celular de fibroblastos NIH-3T3. Como mostrado na figura 24A, PhTX-II se mostrou mais citotóxica do que PhTX-I, já que, a partir de 12,5 µg esta toxina é capaz de provocar a diminuição de 50% de viabilidade celular, PhTX-I, por sua vez, precisou de 100 µg para diminuir o 50 % de viabilidade celular. PhTX-I também foi citotóxica, de maneira dose-dependente e em menor grau para a linhagem NG97 derivada de astrocitoma humano grau III (Fig. 24B).



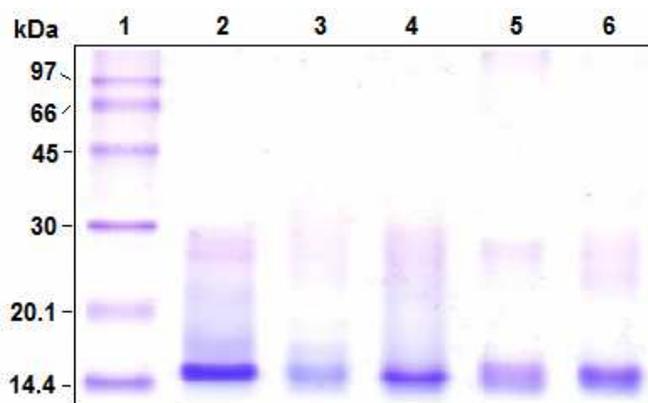
**Figura 24.** Atividade citotóxica *in vitro* das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II sobre cultura celular de fibroblastos NCIH-3T3 (A) e astrocitoma humano NG97 (B). A viabilidade celular foi estimada pelo teste de vermelho neutro, comparando a DO a partir das células controle (não tratadas) considerado como 100 % viáveis. Os ensaios foram feitos em triplicata. \*( $p < 0.05$ ).

### 4.3 Modificações químicas na miotoxina PLA<sub>2</sub> PhTX-I.

Uma estratégia utilizada para elucidar a relação entre atividade catalítica e efeitos farmacológicos das PLA<sub>2</sub> baseia-se na modificação química de resíduos específicos nestas enzimas (Soares e Giglio, 2003). Descrevemos as modificações químicas na PhTX-I nos resíduos de aminoácidos His, Tyr, Trp, Lys e os efeitos de tais modificações sobre as suas propriedades enzimáticas, farmacológicas e estruturais.

#### 4.3.1 Eletroforese em SDS-PAGE da PLA<sub>2</sub> PhTX-I nativa e derivados modificados.

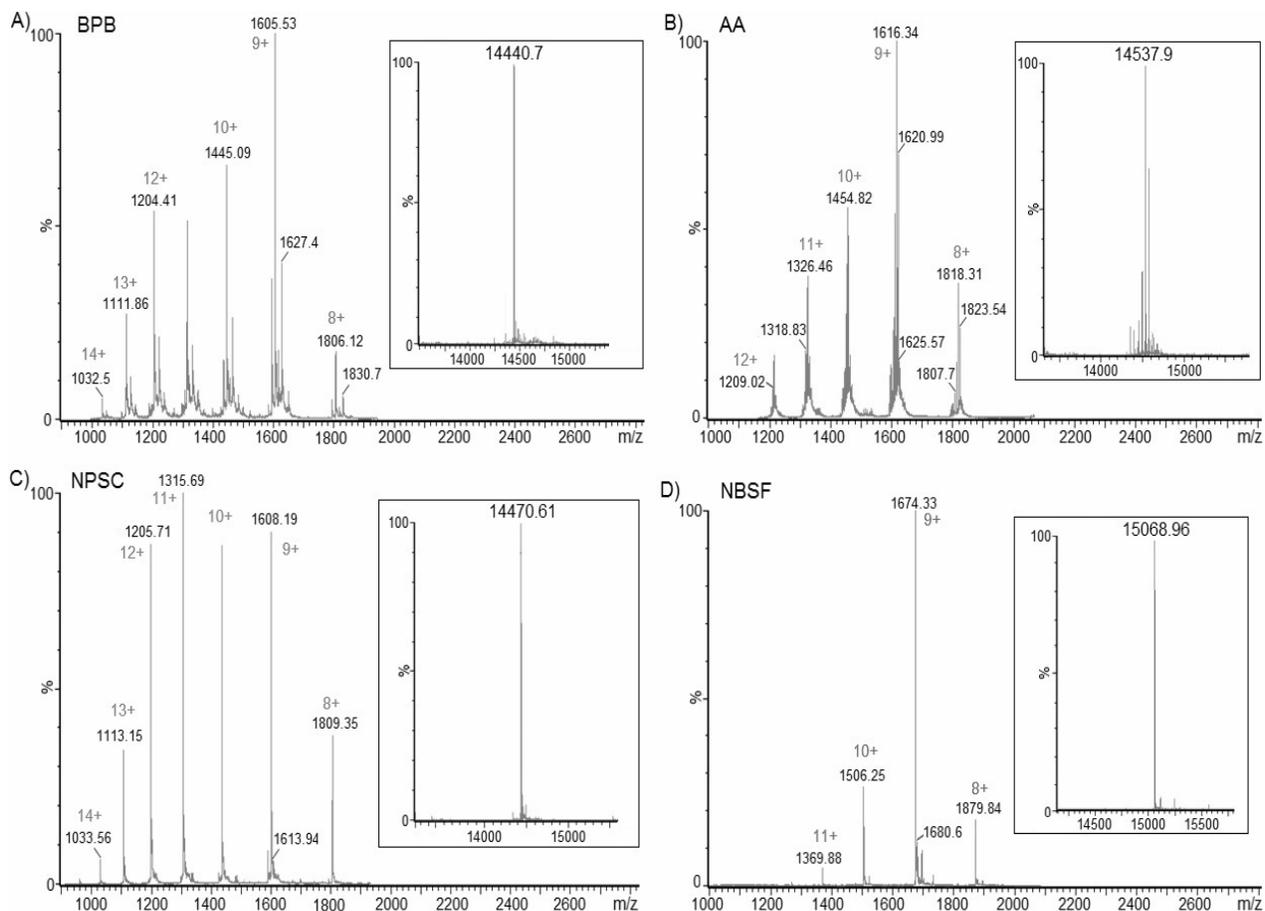
A figura 25 mostra os perfis de massa molecular em SDS PAGE da PLA<sub>2</sub> PhTX-I nativa (pista 2) e das proteínas modificadas com AA, NPSC, NBSF e BPB, nos resíduos Lys, Tyr, Trp e His (pistas 3, 4, 5 e 6, respectivamente). Todas as amostras foram reduzidas com DTT, mostrando para cada amostra a presença de uma única banda eletroforética com massa molecular relativa em torno de 15 kDa, em relação aos marcadores de massa molecular (pista 1).



**Figura 25.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %). SDS-PAGE, corado com comassie blue. Pista 1: marcadores de massa molecular (Mm), Pista 2: PhTX-I nativa; Pista 3: PhTX-I + AA, Pista 4: PhTX-I + NPSC, Pista 5: PhTX-I + NBSF, Pista 6: PhTX-I + BPB. Todas as amostras foram reduzidas com DTT.

#### 4.3.2 Determinação da massa intacta das proteínas modificadas por Espectrometria de Massas Electrospray (ESI).

A análise de massa intacta dos derivados modificados quimicamente da PhTX-I foi determinada por espectrometria de massas Electrospray (ESI). Os resultados mostram massa moleculares de 14.440,70 Da (PhTX-I + BPB), 14.537,90 Da (PhTX-I + AA), 14.470,61 Da (PhTX-I + NPSC) e 15.068,96 Da (PhTX-I + NBSF) (Fig. 26A, B; C e D respectivamente)



**Figura 26.** Espectros de massa crus e deconvolução dos espectros (insetos) da PLA<sub>2</sub> PhTX-I modificada com BPB (A), AA (B), NPSC (C) e NBSF (D) por espectrometria de massas Electrospray (ESI)

#### 4.3.3 Análise de composição de aminoácidos das formas modificadas.

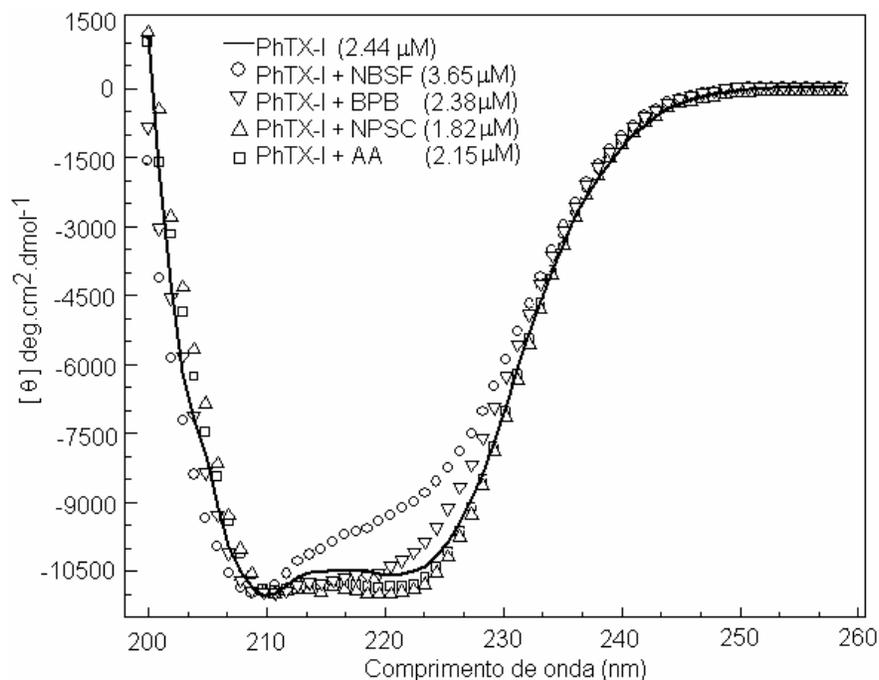
A tabela 7 apresenta o resultado da análise de composição de aminoácidos nas formas modificadas da PLA<sub>2</sub> PhTX-I comparadas com a sequência de aminoácidos da PhTX-I nativa. Modificações feitas nos resíduos de Lys (AA) demonstra a modificação em 7 resíduos, NBSF (modifica Tyr) modificou 4 resíduos de Tyr, BPB (modifica His) modificou 1 resíduo de His. Com a metodologia empregada não foi possível determinar as modificações nos resíduos de Trp.

**Tabela 7.** Composição de aminoácidos da PLA<sub>2</sub> PhTX-I nativa e modificadas do veneno de *P. hyoprrora*. Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteína. <sup>a</sup>Sequência de aminoácidos. <sup>b, c, d</sup> <sup>e</sup>Análise de aminoácidos. (ND) não determinado.

Aminoácidos	PhTX-I nativa <sup>a</sup>	PhTX-I + AA <sup>b</sup>	PhTX-I + NPSC <sup>c</sup>	PhTX-I + NBSF <sup>d</sup>	PhTX-I + <i>p</i> -BPB <sup>e</sup>
Asp	11	10.92 (11)	10.9 (11)	10.72 (11)	10.56 (11)
Glu	6	5.98 (6)	6.12 (6)	5.92 (6)	6.37 (6)
Ser	3	3.37 (3)	3.15 (3)	3.21 (3)	3.03 (3)
Gly	11	11.43 (11)	11.25 (11)	11.39 (11)	11.13 (11)
His	2	1.74 (2)	1.94 (2)	1.6 (2)	0.85 (1)
Arg	6	6.34 (6)	6.09 (6)	6.35 (6)	6.34 (6)
Thr	7	7.62 (7)	6.56 (7)	7.15 (7)	7.42 (7)
Ala	5	4.81 (5)	5.29 (5)	5.34 (5)	5.44 (5)
Pro	6	5.82 (6)	6.01 (6)	6.05 (6)	5.74 (6)
Tyr	10	10.24 (10)	9.79 (10)	5.94 (6)	10.21 (10)
Val	3	3.33 (3)	3.34 (3)	3.49 (3)	3.49 (3)
Met	1	1.47 (1)	1.17 (1)	1.18 (1)	1.45 (1)
Cys	14	13.96 (14)	13.98 (14)	13.74 (14)	13.69 (14)
Ile	2	2.47 (2)	2.35 (2)	2.27 (2)	2.22 (2)
Leu	8	8.29 (8)	8.44 (8)	8.12 (8)	8.01 (8)
Phe	4	3.58 (4)	4.49 (4)	4.74 (4)	4.21 (4)
Lys	17	10.02 (10)	16.93 (17)	17.35 (17)	17.2 (17)
Trp	3	ND	ND	ND	ND

#### 4.3.4 Dicroísmo circular.

Para determinar se as modificações químicas realizadas na PhTX-I causaram mudanças na estrutura secundária da proteína foi utilizada a técnica de dicroísmo circular. A figura 27 mostra o espectro CD da PhTX-I nativa e seus derivados modificados os quais apresentaram duas bandas negativas de magnitude similar (-11,000, -10,500 deg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>) a 208 e 222 nm e uma positiva a 190 nm (dados não mostrados), indicando alto conteúdo de estrutura  $\alpha$ -hélice. A análise do espectro da PhTX-I nativa mostra conteúdo de  $\alpha$ -helices, folhas- $\beta$  e dobras- $\beta$  de 31.9%, 17.9% e 17.1%, respectivamente. O conteúdo da estrutura secundária das proteínas modificadas quimicamente por BPB, NPSC e AA foram muito similares à PhTX-I nativa, sem causar mudanças significativas no espectro CD. Já a PhTX-I tratada com NBSF indica alterações significativas na elipticidade molar da banda negativa a 222 nm (-10,500 para -9,000 deg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>), a análise pelo software indica um conteúdo alterado de  $\alpha$ -helices, folhas- $\beta$  e dobras- $\beta$  (29.8%, 19.2% e 17.7%, respectivamente).

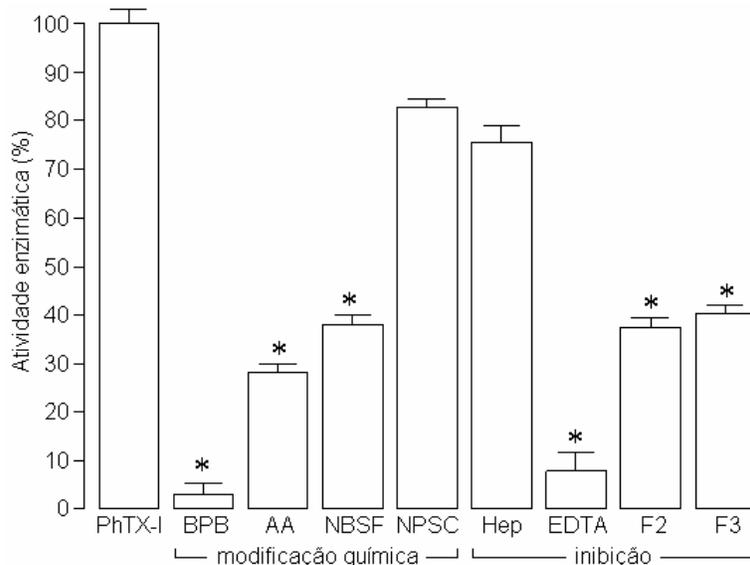


**Figura 27.** Espectros de CD no UV-distante. PhTX-I nativa e as formas modificadas (AA, BPB, NBSF e NPSC). Medidas de CD realizadas a 25 °C, em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 8.

#### 4.3.5 Determinação da atividade PLA<sub>2</sub> das formas modificadas da PhTX-I e inibição.

A figura 28 mostra a atividade enzimática em porcentagem considerando como 100% a atividade enzimática da PhTX-I nativa. A atividade catalítica da PhTX-I foi quase completamente abolida após modificação com BPB, modificação dos resíduos Tyr ou Lys reduziu em mais do 50% a atividade, já o NPSC não causou diminuição significativa da atividade catalítica (Fig. 28). O valor de  $V_o$  para a PhTX-I nativa foi  $13,49 \pm 0,29$  nmoles/min, das formas modificadas os valores foram:  $0,68 \pm 0,21$  (BPB),  $3,78 \pm 0,76$  (AA),  $5,1 \pm 1,22$  (NBSF) e  $11,77 \pm 0,06$  (NPSC) nmoles/min, respectivamente.

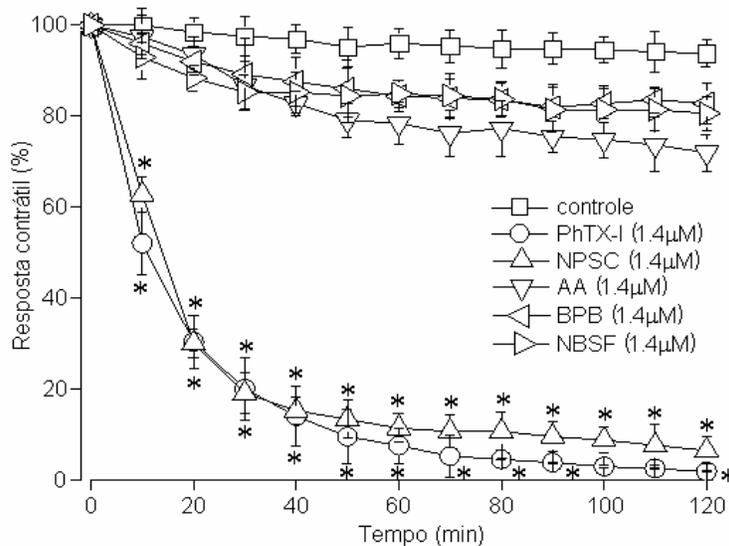
Foi avaliado também o efeito inibitório da Heparina, EDTA, e as crotapotinas F2 e F3 sobre a atividade PLA<sub>2</sub> da PhTX-I. A PhTX-I sob o efeito da heparina teve  $V_o$  de  $10,1 \pm 0,36$  nmoles/min, mostrando uma diminuição de 24,87 % de atividade em relação a atividade da PhTX-I nativa. Com as crotapotinas F2 e F3 de *C. d. collilinetatus* obtiveram-se  $V_o$  de  $5,03 \pm 0,2$  e  $5,4 \pm 0,18$  nmoles/min, respectivamente, ambas inibindo mais de 50 % da atividade enzimática da PhTX-I. Já o EDTA mostrou maior efeito inibitório diminuindo em 89,92 % a atividade de PhTX-I ( $V_o$  de  $1,35 \pm 0,25$  nmoles/min).



**Figura 28.** Atividade PLA<sub>2</sub> proveniente da PhTX-I nativa e das formas modificadas (BPB, AA, NBSF, NPSC), e efeito inibitório de Heparina (Hep), EDTA, crotopinas de *C. d. collinetaus* (F2 e F3) sobre a atividade PLA<sub>2</sub> da PhTX-I (n=3) \*(p<0.05).

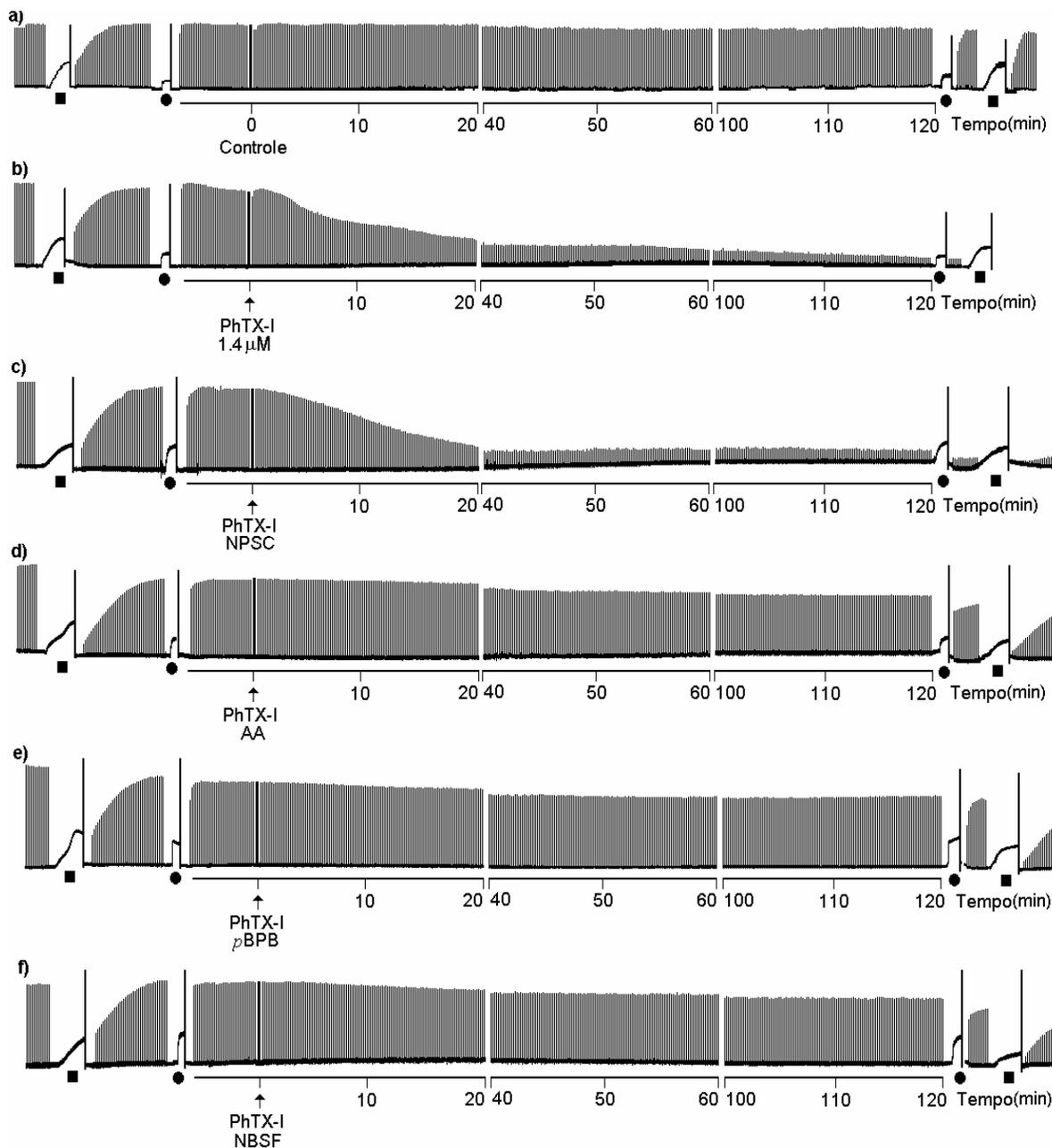
#### 4.3.6 Determinação da atividade paralisante neuromuscular *ex vivo*.

A figura 29 mostra a representação gráfica do bloqueio da resposta contrátil na transmissão neuromuscular na preparação *biventer cervicis* de pintainho da PhTX-I nativa e das suas formas modificadas (1,4 μM). A PhTX-I nativa e a forma modificada com NPSC bloquearam a resposta contrátil de maneira similar, atingindo o 50 % de bloqueio em torno de 15 min. As formas modificadas com BPB, NBSF e AA o bloqueio da resposta contrátil não alcançou o 50 % durante os 120 min que durou o experimento.



**Figura 29.** Representação gráfica do bloqueio da resposta contrátil na transmissão neuromuscular, em preparação *biventer cervicis* de pintainho (estímulo indireto), por ação de PhTX-I nativa, NPSC, AA, BPB, e NBSF (1.4 μM). Cada ponto corresponde à média ± erro padrão de 5 experimentos. \*(p<0.05).

A figura 30 mostra os registros miográficos da resposta contrátil sob a ação da PhTX-I nativa e das suas formas modificadas, evidenciando a falta de bloqueio na transmissão neuromuscular das formas modificadas com BPB, NBSF e AA, bem como as contrações em resposta à acetilcolina (ACh) e ao potássio na forma de KCl, na preparação *biventer cervicis* de pintainho.

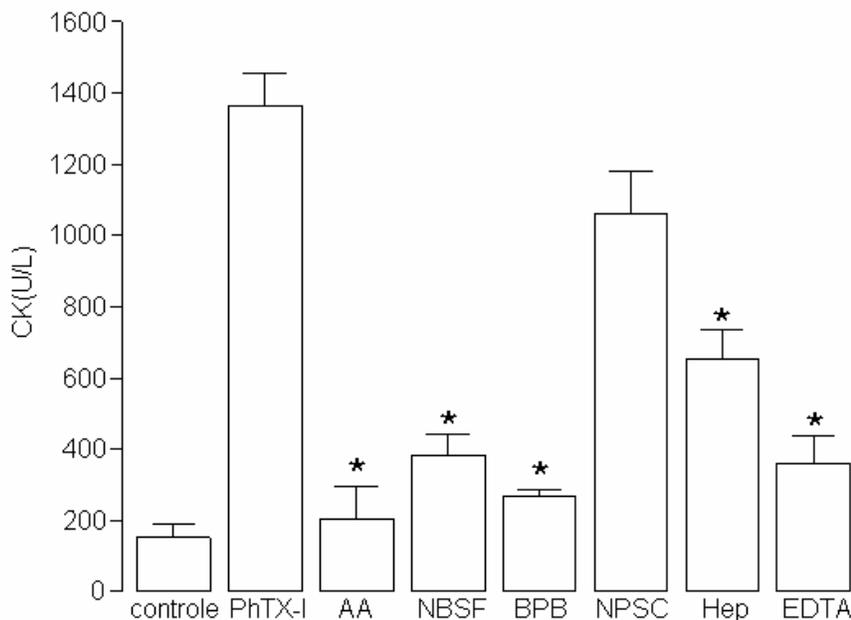


**Figura 30.** Registros miográficos da resposta muscular na preparação de *biventer cervicis* de pintainho em presença de PhTX-I e as suas formas modificadas. a) controle, b) PhTX-I 1,4 μM, c) NPSC 1,4 μM, d) AA 1,4 μM, e) BPB 1,4 μM, f) NBSF 1,4 μM. A contração em resposta à acetilcolina (ACh 110 μM; ●) e ao KCl (20 mM; ■) foi obtida antes e depois da adição das proteínas.

#### 4.3.7 Atividade miotóxica local *in vivo*.

Os estudos realizados para determinar o efeito miotóxico local das formas modificadas da PhTX-I *in vivo* foram feitos em camundongos, inoculando as proteínas por via intramuscular. Resultados anteriores mostraram que 20 µg da PhTX-I nativa incrementam os níveis de CK plasmáticos drasticamente nas primeiras 3 a 6 horas do tratamento, atingindo até níveis de  $1423.37 \pm 52.89$  U/L de CK, para posteriormente voltar a níveis normais, após 9 horas (Fig.19). A figura 31 mostra o efeito miotóxico induzido pela PhTX-I nativa e as formas modificadas. Comparando os níveis de CK 3 horas após iniciado o tratamento, a miotoxicidade local induzida por PhTX-I foi reduzida em 85 % por tratamento com anidro acético (acetilação de Lys), 80 % por alquilação com BPB, 72 % após modificação de Tyr (NBSF) e 20 % após modificação de Trp (NPSC).

Foi investigado também o efeito de inibidores sobre a atividade miotóxica de PhTX-I. Os resultados evidenciam que a heparina inibe o efeito miotóxico da PhTX-I em 47%, já que o máximo nível de CK liberado é de  $725.94 \pm 137.25$  U/L às 3 horas de exposição à toxina em comparação a PhTX-I nativa. O EDTA tem maior efeito inibitório da atividade miotóxica da PhTX-I, reduzindo em 74% esta atividade 3 horas após a aplicação da toxina.



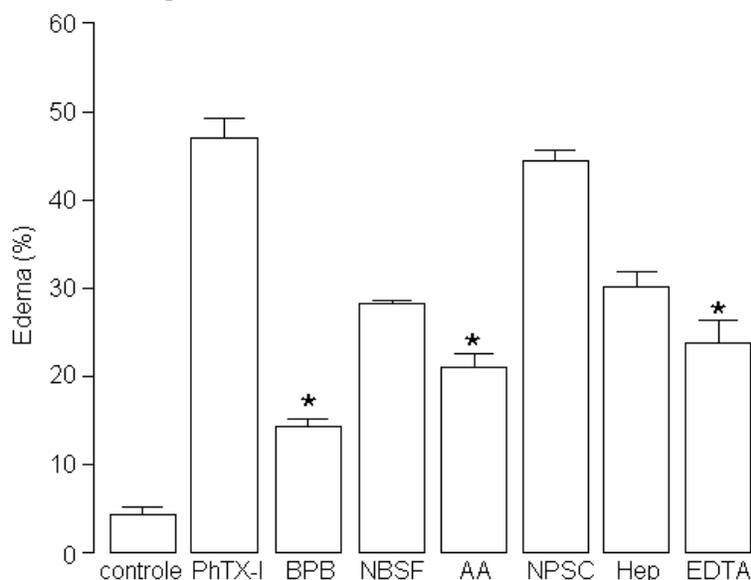
**Figura 31.** Representação gráfica da atividade miotóxica local da PhTX-I nativa e das suas formas modificadas (AA, NBSF, BPB e NPSC) e incubadas com Heparina (Hep) e EDTA. Mostra-se os níveis de creatino quinase (CK), incrementados após 3 horas da administração intramuscular das proteínas (20 µg), (n=5). Comparação dos tratamentos em relação à PhTX-I nativa \*( $p < 0.05$ ).

#### 4.3.8 Determinação da atividade edematogênica.

Para o estudo do efeito das modificações químicas da PhTX-I sobre a atividade inflamatória, verificou-se um dos eventos que ocorre neste processo, a formação de edema. Para isto PhTX-I e as suas formas modificadas com NPSC, NBSF, AA e BPB, todas na dose de 1 µg foram dissolvidas em 50 µl de PBS, e aplicadas sob a região intraplantar da pata direita de camundongos (18 – 20 g). A pata esquerda recebeu 50 µl de PBS como controle. As medidas foram feitas após 1 hora de aplicação das toxinas.

O edema é expresso como o percentual de aumento em volume da pata direita com relação à pata esquerda. O efeito edematogênico induzido pela PhTX-I foi marcadamente reduzido após alquilação da His com BPB e acetilação de Lys com anidrido acético (edema inibido em 70 % e 55 %, respectivamente). Este efeito foi parcialmente reduzido pela modificação de resíduos de Tyr pelo NBSF (40 %). A modificação dos resíduos de Trp não mostrou redução significativa no efeito edematogênico (6 %). As comparações são realizadas uma hora após o início do tratamento (Fig. 32).

Foi avaliado também o efeito de inibidores sobre a atividade inflamatória de PhTX-I. Os resultados evidenciam que a heparina inibe o efeito edematogênico da PhTX-I em 32 %, após uma hora de exposição à toxina, já o EDTA teve um maior efeito inibitório, diminuindo 43 % do efeito edematogênico induzido pela PhTX-I nativa.

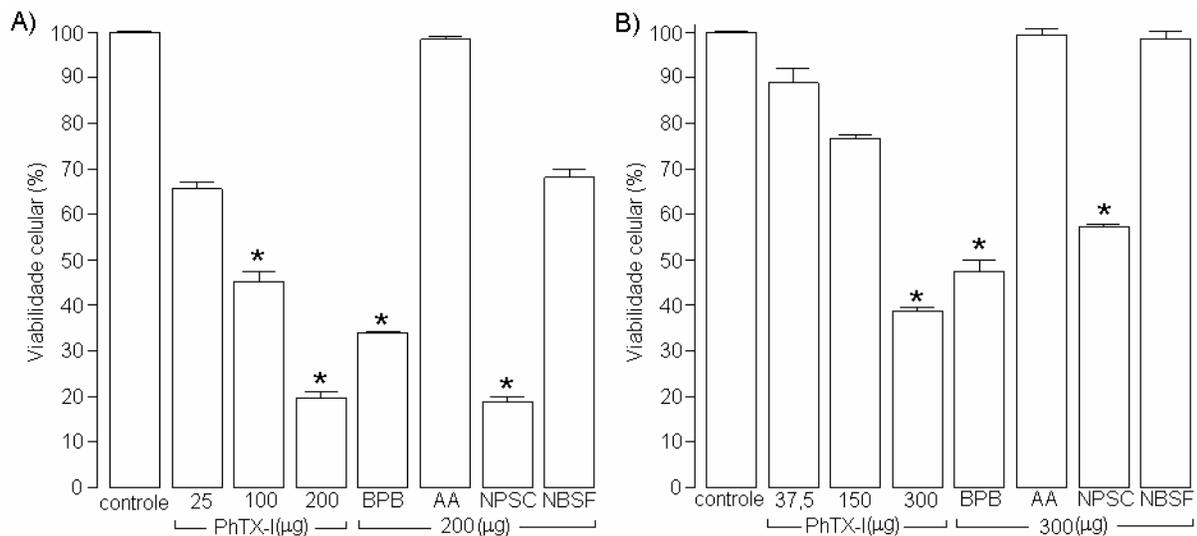


**Figura 32** Atividade edematogênica da PLA<sub>2</sub> PhTX-I, das formas modificadas com NPSC, NBSF, AA BPB e da inibição com Heparina (Hep) e EDTA em camundongos (18-20 g). A medida foi feita 1 hora após aplicação das toxinas. Cada ponto representa a média ± o desvio-padrão de um grupo de 5 animais. Comparação dos tratamentos em relação à PhTX-I nativa \*( $p < 0.05$ ).

#### 4.3.9 Determinação da atividade citotóxica.

Foi avaliada a atividade citotóxica da PhTX-I nativa e as formas modificadas quimicamente sobre as linhagens celulares NG97 e NCIH-3T3. Foram utilizadas várias concentrações da PhTX-I e 200 ou 300  $\mu\text{g}$  das formas modificadas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do vermelho neutro, comparando as absorbâncias dos tratamentos com as do controle (células não tratadas).

PhTX-I nativa foi citotóxica, de maneira dose-dependente, para a linhagem celular de fibroblastos NIH-3T3 e em menor grau para a linhagem NG97 derivada de astrocitoma humano grau III (Figs. 33A e B, respectivamente). A atividade citotóxica da PhTX-I foi independente da atividade enzimática devido a que PhTX-I alquilada com BPB (desprovida de atividade catalítica) induz o efeito citotóxico em ambos os tipos celulares. O tratamento com NPSC não alterou significativamente a atividade citotóxica da PhTX-I. Por outro lado, acetilação e sulfonação dos resíduos de Lys e Tyr (PhTX-I tratadas com AA e NBSF, respectivamente), reduziram fortemente a atividade citotóxica da PhTX-I em ambos os tipos celulares.



**Figura 33.** Atividade citotóxica *in vitro* da PhTX-I nativa e seus derivados modificados quimicamente com BPB, AA, NBSF, NPSC sobre cultura celular de fibroblastos NCIH-3T3 (A) e cultura celular NG97 de astrocitoma humano (B). A viabilidade celular foi estimada pelo teste de vermelho neutro, comparando a DO a partir das células controle (não tratadas), considerado como 100% viáveis. Os ensaios foram feitos em triplicata. \*( $p < 0.05$ ).

## 5. DISCUSSÃO.

### 5.1 Purificação e caracterização bioquímica das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.

No estado da Amazonia (Brasil) os envenenamentos ofídicos ocorrem por pelo menos sete serpentes da família Viperidae: *Bothriopsis bilineata*, *Bothriopsis taeniata*, *Bothrops atrox*, *Bothrops brazili*, *Crotalus durissus*, *Lachesis muta muta* e *Porthidium hyoprora* (Campos *et al.*, 1999; Otero *et al.*, 2002; Campbell *et al.*, 2004). Numerosas PLA<sub>2</sub> têm sido identificadas e caracterizadas a partir desses venenos (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Damico *et al.*, 2005; Porto *et al.*, 2007; Huancahuire-Vega *et al.*, 2009; Pereañez *et al.*, 2009), entretanto, informação a respeito das atividades tóxicas de PLA<sub>2</sub> a partir do veneno de *P. hyoprora* ainda é escassa.

De acordo com Angulo e Lomonte (2009) o isolamento e caracterização de componentes individuais do veneno constitui o suporte da Toxinologia, como uma estratégia fundamental para analisar e entender a série complexa de eventos envolvidos no envenenamento.

No presente trabalho descrevemos a purificação, caracterização bioquímica/farmacológica e a sequência de aminoácidos de duas PLA<sub>2</sub> denominadas PhTX-I e PhTX-II, isoladas a partir do veneno de *P. hyoprora*, com o objetivo de entender sua participação nos eventos fisiopatológicos ocasionados pelo envenenamento desta serpente.

O método de purificação proposto mostra-se adequado para a purificação das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II a partir do veneno de *P. hyoprora*, pois foi possível isolar as proteínas em um único passo cromatográfico (HPLC de fase reversa). A figura 6 apresenta o fracionamento do veneno total resultando em 20 picos, dos quais os picos 10 e 12, denominados PhTX-I e PhTX-II, respectivamente, mostraram alta atividade PLA<sub>2</sub>, miotóxica, atividade paralisante neuromuscular e foram selecionados para caracterização bioquímica e farmacológica.

A PLA<sub>2</sub> PhTX-I, mostra alta atividade específica (408333 U/mg), ao redor de 1361 vezes mais do que o veneno total (tabela 3), sendo o rendimento neste processo 13 %. PhTX-II é uma fração menor, foi purificada 679 vezes com um rendimento de 4%. Estes valores são maiores do que o obtido por Fuly *et al* (2000) (atividade específica 1428U/mg, rendimento 1,42 %), que purificaram a PLA<sub>2</sub> denominada LM-PLA<sub>2</sub>-II em duas etapas (filtração gel e HPLC-FR), a partir do veneno de *Lachesis muta*. O perfil eletroforético em SDS-PAGE (Fig. 8), revela que tanto a PhTX-I como a PhTX-II em condições reduzidas e não reduzidas apresentam uma única banda eletroforética com massa molecular relativa em torno de 14 kDa, sendo portanto constituídas de uma única cadeia polipeptídica. Brazilitoxina III de *B. brazili* (Huancahuire-Vega *et al.*, 2009;

Fernandes *et al.*, 2012), b/D-PLA<sub>2</sub> de *B. leucurus* (Higuchi *et al.*, 2007) e LmTX-I de *L. muta muta* (Damico *et al.*, 2005) são algumas das PLA<sub>2</sub> de veneno de serpente da família Viperídeos que também possuem estrutura monomérica.

Os valores de massa molecular das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e II obtidas por espectrometria de massas Maldi-tof (Fig. 9) são similares a outras PLA<sub>2</sub> miotóxicas isoladas de veneno de serpente (Ponce-Soto *et al.*, 2007, 2010; Perumal *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2010). A análise da composição global de aminoácidos das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e II mostra que as proteínas possuem caráter básico, apresentando um alto conteúdo de aminoácidos tanto de caráter básico quanto hidrofóbico (tabela 4). A presença de 14 Cys sugere a formação de 7 pontes dissulfeto, característica que contribui para a elevada estabilidade da estrutura terciária das proteínas, concordando com descrições reportadas para miotoxinas PLA<sub>2</sub> isoladas de venenos viperídeos (Ponce-Soto *et al.*, 2007; Randazzo-Moura *et al.*, 2008; Calgarotto *et al.*, 2008; Romero-Vargas *et al.*, 2010).

O resultado da análise da estrutura primária mostra que a PhTX-I está composta de 123 resíduos de aminoácidos, compartilhando as sequências conservadas de domínios comuns ao grupo das PLA<sub>2</sub> D49, incluindo as 14 cisteínas, a alça de ligação ao cálcio localizada em (Y)27, (G)29, (G)31, (G)32 e o sítio catalítico formado por (H)48, (D)49, (Y)52 e (D)89. A presença de um resíduo de ácido aspártico na posição 49 na sequência completa de aminoácidos (Figs. 10 e 11), nos permite classificar a PhTX-I como parte da família das PLA<sub>2</sub> D49.

A comparação da sequência de aminoácidos da PLA<sub>2</sub> PhTX-I mostra um alto grau de homologia com outras PLA<sub>2</sub> D49 miotóxicas provenientes de veneno botrópico (Fig. 11). Uma das regiões altamente conservadas na sequência de aminoácidos das PLA<sub>2</sub> é a alça de ligação ao Ca<sup>2+</sup>, segmento formado pelos aminoácidos a partir de (Y)24 até (G)35, que contém quatro resíduos de glicina nas posições 26, 30, 32, 33 e dois resíduos de cisteína nas posições 27 e 29. Os resíduos que formam a alça de ligação ao Ca<sup>2+</sup> assim como o sistema catalítico da PLA<sub>2</sub> PhTX-I exibem um alto grau de conservação, refletido na sua alta atividade catalítica (Huancahuire-Vega *et al.*, 2011). A PLA<sub>2</sub> miotóxica PhTX-I mostrou também completa homologia com outras PLA<sub>2</sub> para os resíduos (L)2, (W/F)3, (I)9, (Y)22, (C)29, (C)45 e (A)93, cujas cadeias laterais hidrofóbicas formam as paredes do canal hidrofóbico para a ligação com o substrato. As cadeias laterais destes resíduos são direcionadas ao interior do canal, podendo interagir com os fosfolípidios de membrana (Singh *et al.*, 2001).

A região N-terminal exibe papel importante para a catálise assim como para algumas atividades farmacológicas (Qin *et al.*, 2005) e é altamente conservada nas PLA<sub>2</sub> ativas cataliticamente. Vários trabalhos mostram evidências que os resíduos de aminoácidos nas posições (L)2, (Y)3, (Q)4, (K)6, (I)9 (E)12 e (T)13 na região N-terminal contribuem funcionalmente facilitando uma orientação adequada da PLA<sub>2</sub> na superfície das membranas celulares (Qin *et al.*, 2004, 2005). A substituição de (Y)3 por (W)3 e (Q)4 por (E)4 na PLA<sub>2</sub> PhTX-I sugere que os resíduos substituídos contribuem para a manutenção da configuração do bolso hidrofóbico na região N-terminal, já que as mudanças presentes na PhTX-I não alteram a função catalítica, permitindo que o substrato lipídico tenha acesso ao sítio catalítico da PLA<sub>2</sub>.

A sequência de aminoácidos da PLA<sub>2</sub> PhTX-II também mostrou a presença de um resíduo de Asp na posição 49 (Figs. 12A e 13), crucial para a atividade catalítica (Arni e Ward 1996, Calgarotto *et al.*, 2008, Ponce-Soto *et al.*, 2010, Huancahuire-Vega *et al.*, 2009, 2011) e colocando esta toxina na família das PLA<sub>2</sub> de veneno cataliticamente ativas, de maneira similar à PhTX-I e a muitas PLA<sub>2</sub> purificadas a partir de venenos Viperídios nas quais o Asp49 é um aminoácido altamente conservado (Damico *et al.*, 2005; Pereañez *et al.*, 2009). O terceiro peptídeo obtido após a digestão trípica da PhTX-II (Tabela 6 e Fig. 12B) evidencia a presença dos aminoácidos envolvidos na ligação ao cálcio, fato refletido na alta atividade catalítica exibida pela toxina.

Foi determinada a composição da estrutura secundária das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II através de dicroísmo circular. A análise dos espectros (Fig. 14) indica que a estrutura secundária predominante destas toxinas PLA<sub>2</sub> consiste de  $\alpha$ -hélices. A contribuição de 30% de  $\alpha$ -hélice na sua estrutura é compatível com as estruturas cristalográficas das PLA<sub>2</sub> de veneno viperídico (Fig. 2) nas quais é evidenciada a presença de três  $\alpha$ -hélices que fazem parte da região N-terminal e o canal hidrofóbico de acesso ao sítio catalítico, sendo estas regiões relacionadas com funções importantes para a catálise assim como para as atividades farmacológicas (Kao *et al.*, 2008, Diz Filho *et al.*, 2009, Toyama *et al.*, 2011).

Estas características estruturais comuns às PLA<sub>2</sub> foram refletidas na alta atividade enzimática tanto da PhTX-I como da PhTX-II, as quais apresentaram maior atividade PLA<sub>2</sub> do que o veneno total de *P. hyoprora* (Fig.15A), devido à maior concentração das enzimas em solução do que no veneno bruto. Esses valores (10 - 14 nmoles/min) correspondem a PLA<sub>2</sub> com

alta atividade catalítica (Pereañez *et al.*, 2009; Calgarotto *et al.*, 2008; Huancahuire-Vega *et al.*, 2009).

PhTX-I e II mostraram um comportamento sigmoidal principalmente em baixas concentrações de substrato (Fig. 15B), resultados que concordam com o descrito por Pereañez *et al.*, 2009 para a PLA<sub>2</sub> Cdcum6 de *Crotalus durissus cumanensis* e por Calgarotto *et al.*, 2008 para a BmTX-I de *B. moojeni*. Este comportamento cinético de reação é típico das enzimas alostéricas com múltiplos centros ativos e operando de modo cooperativo. Porém esse mecanismo não parece ser usado pelas PLA<sub>2</sub> PhTX-I e II, pois estas toxinas são enzimas monoméricas com um único sítio ativo. Algumas proteínas como a glicocinase (enzima monomérica com um único sítio ativo) possuem uma cinética alostérica no início de sua ligação (baixa afinidade) com o substrato, e proporciona uma alteração da arquitetura molecular do sítio ativo preparando essa região para a molécula de substrato seguinte, expressando uma alta afinidade (Cornish-Bowden e Cardenas, 1987). A ligação com o substrato induz mudanças de conformação, de modo que ao final do ciclo catalítico a glicocinase mantém uma alta afinidade pela seguinte molécula de substrato sugerindo que essa cooperatividade positiva obedece a um mecanismo mnemônico (Kamata *et al.*, 2004). PhTX-I e II apresentadas nesse trabalho são enzimas monoméricas com tendência alostérica sugerindo provavelmente um mecanismo de cooperatividade positiva mnemônico.

A atividade enzimática ótima ocorreu em pH 8 e 37 °C (Figs. 15C e D), tanto PhTX-I quanto PhTX-II precisam obrigatoriamente do cálcio para quebrar o substrato (Fig. 15E e F). O íon Ca<sup>2+</sup> direciona o posicionamento do substrato no sítio ativo da enzima sugerindo que esse arranjo do sítio catalítico apresenta uma conformação exclusiva para o Ca<sup>2+</sup>, o que explicaria a diminuição da atividade enzimática tanto da PhTX-I como da PhTX-II na presença dos outros cátions.

## 5.2 Caracterização farmacológica das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II.

Envenenamento ofídico é um problema de saúde pública mundial, particularmente em países tropicais e subtropicais. Para entender como o veneno exerce sua toxicidade requerem-se dados quantitativos sobre a ocorrência de toxinas individuais e suas atividades em determinados venenos (Calvete *et al.*, 2009). Com essa finalidade foi investigado um perfil de atividades

tóxicas induzidas pelas PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II e pelo veneno total de *P. hyoprora*, incluindo a atividade paralisante neuromuscular, miotoxicidade, atividade edematogênica e citotóxicidade.

Algumas PLA<sub>2</sub> agem especificamente no sistema nervoso periférico paralisando a vítima, como as neurotoxinas produzidas pelas serpentes *Bungarus multicinctus* ( $\beta$ -bungarotoxina), *Oxyuranus scutellatus scutellatus* (taipoxina) e *Pseudonaja textilis* (textilotoxina) (Prasarnpun *et al.*, 2005). Outras PLA<sub>2</sub> afetam tanto o sistema nervoso periférico assim como o músculo esquelético, como a crotoxina de *C. d. terrificus* (Gutiérrez *et al.*, 2008), que além do bloqueio neuromuscular, induzem miotoxicidade sistêmica, associado com incrementos na atividade plasmática de enzimas derivadas de músculo como a creatino kinase (CK) (Warrell, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2008).

As PLA<sub>2</sub> das serpentes da família Viperidae (gêneros *Bothrops*, *Porthidium*, *Bothriopsis*) agem principalmente no músculo produzindo mionecrose local pronunciada (Lomonte *et al.*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2008). Embora a atividade miotóxica destas PLA<sub>2</sub> seja acompanhada por outros efeitos tóxicos como edema, hiperalgesia e liberação de citoquinas pró-inflamatórias (Lomonte *et al.*, 2003), não há evidências clínicas reportadas de neurotoxicidade. É por isso que elas têm sido classificadas como miotoxinas não neurotóxicas (Lomonte *et al.*, 2003). Porém, uma série de estudos usando preparações neuromusculares *ex vivo* isoladas de aves e mamíferos, vêm mostrando que as PLA<sub>2</sub> de espécies da família Viperidae induzem bloqueio neuromuscular (Gallacci *et al.*, 2006; Ponce-Soto *et al.*, 2007; 2010; Randazzo-Moura *et al.*, 2008; Calgarotto *et al.*, 2008; Huanchuire-Vega *et al.*, 2009; Romero-Vargas *et al.*, 2010).

No presente trabalho, foi avaliada a atividade paralisante neuromuscular *ex vivo* do veneno total de *P. hyoprora* e das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II, usando a preparação *biventer cervicis* isolada de pintainho. O veneno total e as PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II induziram bloqueio neuromuscular irreversível, diminuindo a resposta contrátil após a aplicação das toxinas nas diferentes concentrações (Fig. 16).

Abreu *et al.*, 2007 observou que as preparações neuromusculares de ave são mais sensíveis para os venenos botrópicos do que as preparações de mamíferos, em concordância com essa afirmação tanto a PhTX-I como a PhTX-II bloquearam 50 % da resposta neuromuscular ao redor de 15 minutos (Fig. 17). Eficiência similar foi observada para a LmTX-I, uma PLA<sub>2</sub> D49 com atividade paralisante da transmissão neuromuscular isolada do veneno de *L. muta muta* (Damico *et al.*, 2006).

A preparação neuromuscular *biventer cervicis* possui fibras musculares com inervações multifocais. Esta preparação pode ser estimulada indiretamente através de pulsos breves no nervo motor, ou diretamente no músculo. Isto permite discriminar entre efeitos neurotóxicos e miotóxicos de um veneno ou toxina. Enquanto a neurotoxicidade causa só a inibição dos estímulos indiretos, a miotoxicidade induz inibição dos estímulos diretos e indiretos (Harvey *et al.*, 1994). Uma vantagem adicional da preparação *biventer cervicis* de pintainho é que pode responder à estimulação elétrica e aos agonistas nicotínicos exógenos. Isso permite diferenciar entre venenos ou toxinas com efeitos pré-sinápticos ou pós-sinápticos. Uma neurotoxina pré-sináptica inibe os estímulos indiretos sem afetar a resposta aos agonistas colinérgicos ou a resposta ao estímulo direto no músculo por estimulação induzida pelo KCl. Neurotoxinas pós-sinápticas inibem a resposta aos agonistas colinérgicos assim como ao estímulo indireto, mas não afetariam às concentrações elevadas de  $K^+$  ou aos estímulos musculares diretos. A presença de componentes miotóxicos no veneno é evidenciada por reduzir a resposta de um músculo esquelético a estímulos elétricos diretos ou exposição a concentrações elevadas de  $K^+$  e/ou iniciar contratura muscular (Harvey *et al.*, 1994).

O veneno total (20  $\mu\text{g/ml}$ ) produz contratura, assim como reduz a resposta ao KCl e ACh após incubação (Fig. 16). Tal inibição poderia envolver dano nos receptores nicotínicos ocasionados por proteases presentes no veneno assim como dano às fibras musculares (Prianti *et al.*, 2003) como acontece com o veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Rodrigues-Simioni *et al.*, 2004). Por outro lado o bloqueio neuromuscular produzido pelas PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II em baixas concentrações de 0,35  $\mu\text{M}$  (dados não mostrados) e 0,7  $\mu\text{M}$  não afetaram a resposta ao potássio (KCl) e a acetilcolina (ACh) (Fig. 19), indicando que a toxina em baixas concentrações não tem ação sobre os receptores pós-sinápticos colinérgicos e nem causou dano muscular que impedisse a contratura em resposta ao KCl. Neurotoxinas com atividade pré-sináptica são capazes de abolir a resposta contrátil sem afetar a resposta aos agonistas colinérgicos (Harvey *et al.*, 1994).

Entretanto concentrações maiores das PLA<sub>2</sub> (1,4  $\mu\text{M}$ ) e 3,5  $\mu\text{M}$  (dados não mostrados) aumentaram a linha de base no registro miográfico (Figs. 17C e D), com indicio de contratura muscular leve, assim como inibição em resposta ao KCl e ACh (Fig. 19), sugerindo danos ocasionados na membrana muscular e nos receptores nicotínicos da membrana subsináptica (Harvey *et al.*, 1994). O fato das PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II não afetarem significativamente a

resposta da ACh e KCl, a não ser em altas concentrações, sugere sua ação pré-sináptica primordial. Resultados similares foram encontrados para as PLA<sub>2</sub> BmTX-I, BmjeTX-I e II, isoladas de venenos Viperídios (Calgarotto *et al.*, 2008, Ponce-Soto *et al.*, 2010).

É importante apontar uma clara diferença entre o “efeito bloqueador neuromuscular *ex vivo*” de toxinas capazes de bloquear a transmissão neuromuscular em preparações isoladas, mas que não exercem neurotoxicidade *in vivo* como as PLA<sub>2</sub> Lys 49 homólogas, e o “efeito neurotóxico” daquelas toxinas que exercem ação neurotóxica *in vivo* como as típicas neurotoxinas pré e pós-sinápticas de serpentes Elapídios. Esta afirmação foi recentemente remarcada direcionada principalmente às PLA<sub>2</sub> K49 homólogas (Lomonte *et al.*, 2003; Gallacci e Cavalcante, 2010), mas que pode ser estendida também às PLA<sub>2</sub> D49 de veneno de serpentes botrópicas, já que o envenenamento por estas serpentes não apresenta sinais de neurotoxicidade clinicamente relevantes.

O veneno de serpentes da família Viperidae (que inclui os gêneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Porthidium*, etc), induz predominantemente mionecrose local em animais de experimentação (Gutiérrez e Ownby, 2003), e necrose do tecido muscular ao redor do local da mordida, de acordo com observações clínicas (Warrell, 2005). Esta mionecrose é causada principalmente pelas PLA<sub>2</sub>. Além da mionecrose, as PLA<sub>2</sub> são consideradas as principais mediadoras da desgranulação de mastócitos, edema e inflamação (Texeira *et al.*, 2003) e da miotoxicidade em mioblastos e miotubos (Angulo e Lomonte, 2005).

A miotoxicidade é definida como habilidade da toxina para induzir necrose na musculatura esquelética *in vivo*, a partir de injeção intramuscular ou, *in vitro*, através da incubação com músculos esqueléticos diferenciados (Gutierrez e Ownby, 2003; Lomonte *et al.*, 2003) e é evidenciada pela capacidade de aumentar os níveis plasmáticos de CK após a injeção intramuscular ou intravenosa. As PLA<sub>2</sub> miotóxicas estão entre os principais fatores responsáveis pela necrose da musculatura esquelética observada em casos de envenenamento por serpentes e acredita-se que este evento ocorra devido à ligação destas miotoxinas à membrana plasmática das fibras musculares, levando à alteração na sua permeabilidade (Rufini *et al.*, 1996).

O veneno total e as PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II aumentaram drasticamente os níveis de CK plasmáticos após serem injetadas no músculo gastrocnêmio de camundongos (Fig. 19). Este aumento de CK evidencia dano muscular severo nas fibras musculares injetadas com a toxina, deixando notório seu efeito miotóxico local. Contrariamente, quando administradas por via

intravenosa, os níveis de CK plasmático tiveram valores semelhantes ao controle (Fig. 20), evidenciando a falta de miotoxicidade sistêmica.

Este tipo de miotoxicidade local é característica do veneno das serpentes Viperidae, cujas PLA<sub>2</sub> afetam predominantemente os músculos localizados na região onde o veneno foi injetado (Milani *et al.*, 1997). Estas miotoxinas PLA<sub>2</sub> caracterizam-se por induzir dano muscular localizado, de ação rápida e pouca miotoxicidade adicional ocorre após esse dano inicial. Provavelmente as PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II, não tem especificidade e se ligam às células musculares e não musculares no lugar da injeção. Esta idéia concorda com a hipótese de ação diferenciada para miotoxinas que agem local ou sistemicamente proposta por Gutierrez e Ownby (2003) e a hipótese geral proposta por Kini e Evans (1989), através da qual se explica a especificidade farmacológica das PLA<sub>2</sub> de veneno. Estas PLA<sub>2</sub> miotóxicas locais unem-se predominantemente a diferentes tipos celulares, além de fibras musculares, e chegam a ser rapidamente seqüestradas após injeção.

Por outro lado, as PLA<sub>2</sub> miotóxicas sistêmicas como as PLA<sub>2</sub> F6 e F6a de *Crotalus durissus collilineatus* (Gutierrez *et al.*, 2008) possuem alta seletividade para fibras musculares esqueléticas e não se unem às outras células. Esta especificidade permite às miotoxinas sistêmicas difundirem além do sítio de injeção, alcançando a corrente sangüínea e células musculares distantes, causando rbdomiolise. Gutierrez e Ownby, (2003) propõem que as PLA<sub>2</sub> miotóxicas ligam-se aos receptores da membrana plasmática, os quais poderiam se tratar de lipídios ou proteínas, podendo diferir sua afinidade pelas PLA<sub>2</sub>. Ao se ligarem, estas PLA<sub>2s</sub> miotóxicas produzem destruição da membrana plasmática através de mecanismos catalíticos ou mecanismos independentes de atividade PLA<sub>2</sub>, provocando a entrada de Ca<sup>2+</sup> do fluido extracelular ao citosol, elevando rapidamente a concentração desse cátion. Tal influxo de Ca<sup>2+</sup> inicia uma série de processos celulares degenerativos que levam à célula a “um ponto de não retorno”. As principais consequências do aumento de Ca<sup>2+</sup> são: hipercontração de miofilamentos, alterações mitocondriais, ativação de PLA<sub>2</sub> citosólicas e proteases Ca<sup>2+</sup>-dependentes com as calpainas, etc (Montecucco *et al.*, 2008).

A especificidade do efeito miotóxico *in vivo* das PLA<sub>2</sub> de veneno tem sido atribuída à existência de sítios de ligação específicos na membrana plasmática de células musculares esqueléticas, mas sua natureza exata ainda é desconhecida. Algumas proteínas aceptoras de alta afinidade têm sido identificadas em tecido neuronal (Krizaj e Gubensek, 2000). Por outro lado

uma proteína de membrana multidomínio de 180 kDa conhecida como receptor tipo M foi caracterizada como um sítio de ligação para algumas PLA<sub>2</sub> do grupo I em músculo esquelético (Lambeau *et al.*, 1990). Entretanto não existem evidências do envolvimento de receptores tipo M no efeito miotóxico pelas PLA<sub>2</sub> do grupo II.

Alternativamente, miotoxinas PLA<sub>2</sub> do grupo II poderiam atuar através de reconhecimento de lipídios de membrana, tais como glicerofosfolipídios ou glicolipídios que podem ser expressos diferencialmente, em mioblastos e miotubos. Várias observações sugerem que fosfolipídios carregados negativamente (Diaz *et al.*, 2001) podem ser aceptores importantes para o mecanismo miotóxico destas proteínas (Gutiérrez e Ownby 2003).

As miotoxinas PLA<sub>2</sub> de veneno além de ocasionar necrose muscular (Gutiérrez e Ownby, 2003) causam edema e inflamação (Teixeira *et al.*, 2003). Uma reação inflamatória aguda é o mecanismo de defesa caracterizado por exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas levando à formação de edema local formado por componentes leucócito-dependentes e leucócito-independentes. Essas mudanças vasculares são produzidas por diferentes mediadores os quais agem aumentando a permeabilidade microvascular, para macromoléculas nas vênulas pós-capilares aumentando dessa maneira o efluxo de proteínas plasmáticas (Teixeira *et al.*, 2003).

No presente trabalho avaliamos a resposta inflamatória local produzida pelo veneno total e as PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II de *P. hypoprora* através da formação de edema em pata de camundongo. Os resultados demonstram que tanto o veneno como as PLA<sub>2</sub> PhTX-I e PhTX-II induzem edema pronunciado em pata de camundongo (Fig. 21). Esta atividade foi tempo-dependente e atingiu a resposta máxima nos primeiros 30 minutos.

A formação de edema induzido pelo veneno de *P. hypoprora* é de comportamento similar a outros venenos Viperídios incluindo *B. asper* (Chaves *et al.*, 2006), *B. insularis* (Barbosa *et al.*, 2003), *B. moojeni* (Calgarotto *et al.*, 2008) e *Lachesis muta muta* (Ferreira *et al.*, 2009). As PLA<sub>2</sub> PhTX-I e II induziram edema em pata de camundongo na mesma magnitude que o veneno total, provavelmente pelo menos parte das ações inflamatórias do veneno total são devidas a estas miotoxinas. Porém, outros componentes do veneno tais como serinoproteases, metaloproteases ou lectinas podem contribuir também para as propriedades edematogênicas do veneno total.

Sabe-se que as PLA<sub>2</sub> possuem um papel importante nos processos inflamatórios fornecendo precursores para substâncias lipídicas pro-inflamatórias como mediadores derivados do ácido araquidônico e fatores ativadores de plaquetas (Teixeira *et al.*, 2003), mas os

mecanismos pelos quais os venenos induzem edema não estão claros, o que torna necessários mais estudos para investigar com detalhes se as PLA<sub>2</sub> induzem edema por produtos da via lipoxigenase ou através de produtos da via cicloxigenase.

A mionecrose pode ser o impulso para desencadear a atividade pró-inflamatória e a liberação sistêmica da interleucina-6 (IL-6), de acordo com observações apresentadas pela miotoxina II (PLA<sub>2</sub> K49) do veneno de *B. asper* (Nuñez *et al.*, 2004) e BmTX-I de *B. moojeni* (Calgarotto *et al.*, 2008). IL-6 é a primeira citocina multifuncional envolvida na regulação da resposta imune, hematopoese, e inflamação (Akira *et al.*, 1990) e níveis incrementados têm sido documentados em envenenamentos clínicos por espécies botrópicas (Barraviera *et al.*, 1995; Avila-Aguero *et al.*, 2001). Assim, foram dosados os níveis de IL-6 plasmáticos após injeção intramuscular do veneno total de *P. hyoprora* e da miotoxina PhTX-I. Os resultados mostram que a PLA<sub>2</sub> PhTX-I induz elevação sistêmica dos níveis de IL-6 em camundongos, na mesma magnitude que o veneno total (Fig. 22).

Os tecidos lesados pelas miotoxinas PLA<sub>2</sub> que exercem ação local são rapidamente infiltrados por leucócitos. Como em outros processos agudos, no envenenamento em modelos animais em que se usaram venenos botrópicos, as primeiras células do infiltrado inflamatório a extravasar são os neutrófilos polimorfonucleares, sendo gradualmente substituídos pelo aparecimento de células mononucleares, monócitos e linfócitos (Farsky *et al.*, 1997). As células do infiltrado são uma fonte importante de mediadores como as citocinas, produzidas não somente pelos leucócitos do infiltrado, mas também pelas células residentes nos tecidos lesados. Um rápido aumento de IL-6, detectável sistemicamente desde a primeira hora, foi observado, ao injetar-se uma miotoxina PLA<sub>2</sub> purificada do veneno de *B. moojeni* em camundongos, sugerindo que a produção desta citocina é dependente do dano tissular, dando início a uma resposta da fase aguda (Calgarotto *et al.*, 2008). Elevação dos níveis séricos de IL-1, IL-8, interferon-gama (IFN- $\lambda$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico (NO) foram observados após injeção intraperitoneal de veneno de *B. asper*, *B. jararaca*, *B. atrox* em camundongos (Barros *et al.*, 1998; Petricevich *et al.*, 2000). O papel desempenhado por estes mediadores na patogênese do envenenamento não foi ainda estabelecido.

Em pacientes picados por *Bothrops* sp. e *C. d. terrificus* tem sido documentadas elevação de IL-6 sérica (Avila-Aguero *et al.*, 2001). Esses achados abrem a possibilidade de interferir na

lesão tissular local e nos efeitos sistêmicos dos venenos, mediante não só a tradicional soroneutralização, mas também, pela modulação de alguns mediadores inflamatórios.

Estudos usando uma variedade de linhagens celulares em cultura tem demonstrado que as PLA<sub>2</sub> do grupo II exercem ampla atividade citolítica a qual se correlaciona com sua atividade miotóxica *in vivo* (Lomonte *et al.*, 1999). O uso de cultura de mioblastos e miotubos como alvos para as PLA<sub>2</sub> do grupo II tem sido proposto como um modelo *in vitro* útil para estudar os mecanismos miotóxicos, assim como sua correlação com a atividade de lesão muscular observada *in vivo* (Angulo e Lomonte, 2005). Este estudo investigou se a fusão e diferenciação de mioblastos C2C12 os torna mais susceptíveis à ação citolítica da miotoxina PhTX-I do veneno de *P. hyoprora*.

A miotoxina PhTX-I assim como o veneno total não evidenciaram efeito citolítico em células mioblastos de músculo esquelético em doses baixas (5 – 10 µg/poço) (Fig. 23A). Entretanto uma maior susceptibilidade de miotubos foi claramente observada usando a miotoxina PhTX-I com doses a partir de 5 µg/poço (Fig. 23B). Este resultado é devido provavelmente à habilidade desta toxina em desestabilizar a membrana celular que parece envolver a expressão de um maior número de receptores na membrana plasmática. A diferenciação de mioblastos em miotubos deve levar a mudanças que favoreçam especificamente a ação de miotoxinas PLA<sub>2</sub> do grupo II, é provável que essas mudanças envolvam a expressão de um maior número, ou um tipo de afinidade maior, de sítios receptores na membrana plasmática para as PLA<sub>2</sub> miotóxicas. No entanto, a possível participação de processos intercelulares surgidos após a fusão de mioblastos, como observado causando maior dano em miotubos, não pode ser excluído (Angulo e Lomonte, 2005).

Nossos resultados de citotoxicidade da PLA<sub>2</sub> PhTX-I de *P. hyoprora* em mioblastos e miotubos confirmam o proposto por Angulo e Lomonte (2005), ao mostrar aumento dos níveis de lactato desidrogenase (LDH) em cultura celular de miotubos, mostrando uma maior susceptibilidade que em mioblastos C2C12. Por outro lado, doses elevadas de veneno total de *P. hyoprora* ou da PLA<sub>2</sub> PhTX-I (20, 30 e 40 µg/poço) causaram efeitos citolíticos significantes tanto em mioblastos como em miotubos, provavelmente devido á interação com sítios não específicos da membrana celular, como resultado da alta concentração das toxinas.

Numerosas PLA<sub>2</sub> de veneno apresentam atividade citolítica sobre outros tipos celulares, incluídos células cancerosas, como as PLA<sub>2</sub> de *B. jararacussu* (Bonfim *et al.*, 2006), as PLA<sub>2</sub> de

*N. naja* (Das *et al.*, 2011) e as PLA<sub>2</sub> MTX-I e II de *B. brazili* (Costa *et al.*, 2008), entre outras. PhTX-I e PhTX-II foram capazes de produzir citotoxicidade em células da linhagem NIH-3T3 de fibroblastos de maneira concentração-dependente (Fig. 24A). PhTX-II compartilha maior grau de homologia com PLA<sub>2</sub> que apresentam alta atividade citotóxica sobre diversas linhagens celulares, como LmTX-I e a toxina de Mojave (Fig. 13) (Ziolkowski e Bieber, 1992; Damico *et al.*, 2007), esta característica estrutural foi refletida numa atividade citotóxica mais pronunciada do que a PhTX-I.

Adicionalmente, PhTX-I foi citotóxica em altas concentrações sobre linhagem celular NG97 derivada de astrocitoma humano grau III (Fig. 24B). O mecanismo molecular de ação citotóxica das PLA<sub>2</sub> ainda é desconhecido. Alguns autores propuseram que a atividade citotóxica sobre células tumorais está associada com a indução de apoptose (Cummings *et al.*, 2008) e se propõe que a atividade PLA<sub>2</sub> acelere o número de renovação de fosfolipídios, os quais influenciam nas mudanças na membrana que acontecem durante a apoptose (Panini *et al.*, 2001). Entretanto, a relação entre a eficiência catalítica das PLA<sub>2</sub> e sua atividade citotóxica ainda não é claramente definida. Algumas PLA<sub>2</sub> homólogas como a MTX-II exercem suas atividades farmacológicas, incluindo a atividade citotóxica independentemente da atividade catalítica (Costa *et al.*, 2008).

### **5.3 Modificações químicas na miotoxina PhTX-I e seus efeitos sobre as atividades enzimática, farmacológicas e estruturais.**

As relações estrutura-função de várias PLA<sub>2</sub> provenientes de venenos de serpente têm sido pesquisadas extensamente. Com objetivo de elucidar estruturalmente os sítios responsáveis da toxicidade tem-se utilizado várias metodologias, tais como modificações químicas, mutações sítio-dirigidas, técnicas cristalográficas, espectrofotométricas e fluorométricas, assim como ressonância magnética nuclear e estudos da ação de inibidores e substratos naturais ou artificiais (Diaz-Oreiero e Gutiérrez, 1997, Romero-Vargas *et al.*, 2010, Soares e Giglio, 2003).

Com o objetivo de entender as relações estrutura-função da PLA<sub>2</sub> PhTX-I, realizamos modificações químicas de resíduos específicos (His, Lys, Tyr, Trp), e inibição por heparina e EDTA e avaliamos os efeitos de tais modificações sobre as suas propriedades enzimáticas, farmacológicas e estruturais.

Para verificar a homogeneidade e a integridade estrutural das proteínas modificadas foi corrido um gel SDS-PAGE, como mostrado na figura 25. Tanto a PhTX-I nativa como as formas modificadas migraram similarmente na eletroforese, evidenciando a presença de uma única banda eletroforética para cada uma das proteínas, demonstrando alta homogeneidade das amostras assim como pequena ou nenhuma alteração aparente da massa molecular.

A figura 26 mostra os espectros de massa molecular das formas modificadas da PhTX-I, determinadas por espectrometria de massas ESI (ionização positiva). Cada pico representa a molécula proteica levando um diferente número de cargas (prótons) (Fenn *et al.*, 1989). Nas figuras insertas em cada espectro, mostra-se a deconvolução dos espectros obtidos com ajuda do software Maxium Entropy. A forma modificada nos resíduos de Trp com o reagente NPSC, apresenta uma massa molecular intacta de 14470.61 Da, com um aumento de 221.39 Da em relação à massa da proteína nativa PhTX-I, cuja massa molecular é 14249.22 Da (Huancahuire-Vega *et al.*, 2011). Esse valor de aumento na massa indicaria a modificação de um único resíduo de Trp, já que é muito próximo do valor de massa do reagente incorporado (221.62). A forma modificada com anidro acético (massa molecular 14537.90 Da), evidencia que o reagente estaria acetilando 7 resíduos de Lys, pois há um aumento de 288.60 Da, equivalente com sete vezes o valor da massa do radical acetil incorporado no grupamento amino das lisinas (42 Da).

NBSF (*p*-Nitrobenzenesulfonil fluoride) é um reagente específico para modificação de resíduos de Tyr em proteínas, como foi evidenciado em outras PLA<sub>2</sub> (Andrião-Escarso *et al* 2000; Soares *et al.*, 2001b). A forma modificada da PhTX-I com NBSF teve uma massa molecular de 15068.96 Da, 819.74 Da acima do valor da toxina nativa, evidenciando modificação de mínimamente 4 resíduos de Tyr (aumento de 187.16 Da em cada resíduo, correspondentes à porção do reagente NBS que estaria sendo incorporado). A alquilação do resíduo de His nas PLA<sub>2</sub> com BPB vêm sendo uma estratégia usada para entender as relações estrutura-função desta família de proteínas (Yang, 1997). PhTX-I alquilada com BPB teve uma massa molecular de 14440.70 Da, o que indica a modificação de um único resíduo de His.

A comparação da análise de composição de aminoácidos da proteína PhTX-I nativa com as formas modificadas (tabela 7), mostra que sete resíduos de lisina foram modificados, confirmando os dados obtidos na espectrometria de massas. A acetilação de resíduos de lisina de 3 miotoxinas PLA<sub>2</sub> básicas botrópicas (PrTX-I, PrTX-III e BnSP-7) causaram uma perda completa da basicidade, sendo demonstrado por análise eletroforética (Soares *et al.*, 2000a;

2001a), entretanto, a acetilação da PhTX-I estaria modificando menos do 50% de resíduos de lisinas, tendo a proteína modificada um comportamento igual a da proteína nativa no gel de eletroforese.

Na  $\beta$ -Btx a análise de aminoácidos revelou que um único resíduo de Tyr dos catorze, foi modificado por NBSF. Este resíduo foi identificado como Tyr68 na cadeia A da  $\beta$ -Btx (Liao *et al.*, 1982). Nas PLA<sub>2</sub> de *N. naja* e *N. nigricollis* dos nove resíduos de Tyr presentes somente dois foram modificados por NBSF (Yang *et al.*, 1985), sugerindo que os sete resíduos restantes estão “enterrados” no interior da molécula. Nessas enzimas a Tyr3 estaria envolvida na ligação ao fosfolipídio (Meyer *et al.*, 1979) e a Tyr62(63) agiria com o sítio de reconhecimento interfacial (Dam-Mieras *et al.*, 1975). Análises da sequência e composição de aminoácidos da notexina de *Notechis s. scutatus*, revelou que três resíduos de Tyr (Tyr7, 70 e 77) são modificados por NBSF (Yang e Chang, 1991). PhTX-I modificada com NBSF mostra que quatro resíduos de Tyr foram modificados, como evidenciado pela comparação da composição de aminoácidos (tabela 7), estando em concordância com os dados obtidos a partir da análise por espectrometria de massas.

His 48 é um resíduo de aminoácido altamente conservado nas PLA<sub>2</sub>, o qual apresenta papel relevante na catálise (Scott *et al.*, 1992). Vários estudos sobre modificações das PLA<sub>2</sub> de veneno de serpente usando o BPB foram realizados durante os últimos anos (Díaz-Oreiro e Gutiérrez, 1997; Andrião-Escarso *et al.*, 2000; Bazaá *et al.*, 2009; Romero-Vargas *et al.*, 2010). A composição de aminoácidos (tabela 7) revela que PhTX-I modificada com BPB teria um resíduo de histina modificado. Esse resíduo corresponderia a His48, já que a atividade enzimática da proteína foi quase completamente abolida após a modificação, e sendo que a His48 faz parte da tríade catalítica desta família de proteínas. Resultados similares foram encontrados para as PLA<sub>2</sub> D49 PrTX-III de *B. pirajai* (Soares *et al.*, 2001a) e BthTX-II de *B. jararacussu* (Andrião-Escarso *et al.*, 2000).

A nitrofenilsulfonação dos resíduos de Trp com NPSC da PLA<sub>2</sub> Pa-11 do veneno de *P. australis* resultou na modificação de dois resíduos nas posições 31 e 69. Da mesma maneira, o tratamento de várias PLA<sub>2</sub> K49 com NPSC resultou na modificação de 50% dos resíduos de Trp, provavelmente afetando Trp77. Este resíduo é altamente conservado nas PLA<sub>2</sub> K49 e geralmente ausente nas PLA<sub>2</sub> D49 (Soares *et al.*, 2000b, 2001a). A metodologia empregada neste estudo para a análise de composição de aminoácidos não permite determinar os resíduos de Trp, porém, a sequência de aminoácidos da PhTX-I nativa mostrou que ela possui 3 resíduos de Trp, nas

posições 3, 31 e 69 (Huancahuire-Vega *et al.*, 2009) e segundo a análise de massas um resíduo de Trp estaria sendo modificado.

Com a finalidade de determinar se as modificações químicas realizadas na PhTX-I têm causado mudanças na estrutura secundária da proteína, foi utilizada a técnica de dicroísmo circular. O espectro de CD da proteína PhTX-I nativa indica que a estrutura secundária predominante desta PLA<sub>2</sub> consiste de  $\alpha$ -hélices (Fig. 27), fato que concorda com resultados obtidos para outras PLA<sub>2</sub> como as da cobra Taiwan (Kao *et al.*, 2008), PLA<sub>2</sub>A de *C. d. ruruima* (Diz Filho *et al.*, 2009), e BnIV de *B. newidii* (Toyama *et al.*, 2011). A estrutura secundária das formas modificadas quimicamente da PhTX-I não foi alterada significativamente após as modificações, como evidenciado pelo espectro CD. Assim, observamos que as modificações químicas, executadas nesse estudo, principalmente afetaram os resíduos específicos envolvidos em tais modificações e não resultaram em mudanças conformacionais drásticas na molécula. Somente a toxina tratada com NBSF apresentou certas mudanças detectáveis na composição da estrutura secundária.

Kini (2003) descreveu que a alquilação pelo BPB não afeta a estrutura tridimensional das PLA<sub>2</sub> nem sua habilidade de ligar fosfolípidos, porém pode alterar a capacidade de interagir com proteínas específicas ou ligantes. A comparação entre as estruturas cristalográficas da PLA<sub>2</sub> ácida nativa e a modificada quimicamente pelo BPB de *Agkistrodon halys* Pallas revelou notável similaridade entre as estruturas (Zhao *et al.*, 1998), já as análises comparativas entre os modelos cristalográficos da PrTX-I-BPB e da PrTX-I indicaram mudanças pouco significativas de estrutura terciária e da conformação oligomérica (Marchi-Salvador *et al.*, 2009). A existência de mudanças pouco significativas na estrutura terciária das PLA<sub>2</sub> complexadas com BPB confirmaria uma mínima alteração nas suas estruturas secundárias, como é observado no espectro de CD para PhTX-I modificada com BPB.

A heparina diminuiu ligeiramente a atividade enzimática da PhTX-I (Fig. 28), de forma semelhante, este composto polianiónico resultou também como modulador alostérico negativo da PLA<sub>2</sub> de *C. d. cascavella* (Beghini *et al.*, 2000). Por outro lado, EDTA diminuiu notavelmente a atividade catalítica de PhTX-I, similarmente à  $\beta$  bungarotoxina e notexina, que foram inibidas por EDTA, mesmo na presença de um excesso de Ca<sup>2+</sup> (Shina *et al.*, 1990).

As crotapotinas são proteínas ácidas não catalíticas e farmacologicamente inativas que se ligam especificamente às PLA<sub>2</sub> de diferentes origens (pancreática, abelha, veneno serpente),

inibindo sua atividade catalítica (Landucci *et al.*, 2000). As isoformas de crotapotinas F2 e F3 de *C. d. collilineatus* inibiram significativamente a atividade enzimática da PhTX-I em aproximadamente 55% (Fig. 28). Nossos resultados estão de acordo com os reportes da PLA<sub>2</sub> BjIV de *B. jararacussu*, a qual foi inibida em 50% na sua atividade catalítica pelas crotapotinas F7 de *C. d. terrificus*, F3 e F4 de *C. d. collilineatus* e *C. d. cascavella* (Bonfim *et al.*, 2001). Esses resultados sugerem que as crotapotinas podem ligar-se às PLA<sub>2</sub> botrópicas de maneira similar às PLA<sub>2</sub> crotálicas e aumentam a possibilidade de existência nos venenos botrópicos de moléculas crotapotinas-like as quais inibem a atividade catalítica das suas PLA<sub>2</sub> (Bonfim *et al.*, 2001).

Já se tem demonstrado que PhTX-I é uma miotoxina, capaz de induzir miotoxicidade local *in vivo*, assim como edema de pata em camundongos e efeito paralisante neuromuscular *ex vivo* na preparação neuromuscular *biventer cervicis* de pintainho (Huancahuire-Vega *et al.*, 2011). As modificações nos resíduos de His, Tyr, Lys e Trp realizadas na PhTX-I foram avaliadas através da comparação dos seus efeitos na miotoxicidade local, formação de edema, efeito paralisante neuromuscular e citotoxicidade. A modificação seletiva desses aminoácidos tem sido escolhida para entender a função biológica, já que estes resíduos de aminoácidos tem participação importante na atividade catalítica e na ligação ao substrato (Verheij, 1980).

A acetilação dos resíduos de Lys reduziu significativamente a atividade enzimática de PhTX-I, entretanto foi detectada atividade residual ao redor de 27% (Fig. 28), similarmente a MT-III (*B. asper*) e MT-I (*B. godmani*) (Díaz-Oreiro e Gutiérrez, 1997). O modo específico de acetilação não é claro, mas existem evidencias de redução da capacidade da enzima em ligar-se ao cálcio e portanto redução da atividade enzimática (Yang, 1997). Contrariamente, os efeitos miotóxico (Fig. 31) e citotóxico (Fig. 33) foram completamente anulados, já o efeito edematogênico foi diminuído em menor grau (Fig. 32). Estes resultados concordam com observações apresentadas previamente em estudos nos quais resíduos de Lys de PrTX-I, PrTX-III e BnSP-7 PLA<sub>2</sub>, foram modificados por acetilação diminuindo drasticamente suas atividades miotóxica, edematogênica e bactericida (Soares *et al.*, 2000a, 2000b, 2001a). A acetilação de Lys na PhTX-I diminuiu também seu efeito neurotóxico em maior grau do que foi afetada a atividade enzimática (Fig. 29). Estes efeitos maiores sobre as propriedades farmacológicas do que sobre a atividade catalítica demonstra que existe dissociação entre as atividades enzimática e farmacológicas evidenciando a existência de regiões moleculares diferentes ao sítio catalítico, as

quais seriam responsáveis por pelo menos alguma atividade farmacológica desta toxina em concordância com resultados similares a outras PLA<sub>2</sub> (Rosenberg *et al.*, 1989; Andrião-Escarso *et al.*, 2000; Soares e Giglio, 2003).

Soares *et al.*, (2001a) sugeriu que o efeito bactericida de PrTX-III e da miotoxina III de *B. pirajai* e *B. asper*, respectivamente, pode ser relacionado à basicidade da proteína, à presença da hélice N-terminal e aos resíduos 115 – 125 da região C-terminal, esta última rica em aminoácidos básicos e aromáticos, os quais tem sido identificados como determinante estrutural deste efeito (Lomonte *et al.*, 2003). Peptídeos sintéticos representando a região C-terminal de PLA<sub>2</sub> miotóxicas mostraram atividades citotóxicas e miotóxicas similares às proteínas parentais embora exibam menor potência (Lomonte *et al.*, 2003; Angulo e Lomonte, 2005; Gebrim *et al.*, 2009). Diminuição significativa da atividade miotóxica após incubação com heparina confirma o envolvimento da região C-terminal de PhTX-I no efeito miotóxico, este poliânion estaria interagindo eletrostaticamente com a região C-terminal rica em resíduos Lys (Huacahuire-Vega *et al.*, 2011).

Os resultados também concordam com estudos prévios no qual as lisinas de várias PLA<sub>2</sub> dos venenos de *Naja naja atra* e *Naja nigricollis* foram modificadas através de carbamilação (Condrea *et al.*, 1981), metilação (Ho *et al.* 1986), etoxiformilação e guanidinação (Condrea *et al.*, 1983). Estes estudos mostraram que tais modificações tiveram um maior efeito em algumas propriedades farmacológicas do que na atividade enzimática das toxinas, uma conclusão também alcançada por Babu e Gowda (1994) depois da guanidinação de resíduos de lisina de uma PLA<sub>2</sub> básica de *Vipera russelli*. Assim, as lisinas parecem desempenhar um papel crítico na toxicidade de PLA<sub>2</sub> de veneno de cobra (Diaz-Oreiro e Gutiérrez, 1997).

His48 é um aminoácido altamente conservado nas PLA<sub>2s</sub> e este resíduo faz parte do sistema catalítico nestas enzimas (Scott *et al.*, 1992). A alquilação da His por BPB vem sendo usado amplamente para avaliar o papel da atividade enzimática nas atividades farmacológicas das PLA<sub>2</sub>. Alquilação de His de PhTX-I anulou sua atividade enzimática (Fig. 28), atividades miotóxica, edematogênica e efeito paralisante neuromuscular foram drasticamente reduzidas por esta modificação (Figs. 29, 31, 32), tratamento com EDTA também diminuiu a atividade miotóxica e edematogênica, suportando a hipótese que a hidrólise enzimática de fosfolípidios está envolvido neste efeitos. Similarmente as atividades paralisante neuromuscular e miotóxica foram inibidas quase completamente após alquilação de His48 de Basp-III (*B. asper*), BthTX-II (*B.*

*jararacussu*), PrTX-III (*B. pirajai*), Cdc-9 e Cdc-10 (*C. d. cumanensis*) (Díaz-Oreiro e Gutiérrez, 1997; Andrião-Escarso *et al.*, 2000, Soares *et al.*, 2001a; Romero-Vargas *et al.*, 2010), mostrando que estes efeitos são dependentes da atividade catalítica. Soares *et al.*, (2001a) sugeriu que a atividade enzimática das PLA<sub>2</sub> potencializa estas atividades farmacológicas induzidas pelas miotoxinas botrópicas e crotálicas.

Em contraste, a atividade citotóxica da PhTX-I sobre as linhagens celulares NG97 e NCIH-3T3 não foi afetado pela modificação de His (Fig. 33), indicando que a atividade enzimática não é requerida para a PhTX-I induzir este efeito e que outras regiões da molécula estariam envolvidas na perturbação da membrana celular. Nossos resultados estão de acordo com a atividade da MTX-I e II PLA<sub>2</sub> de *B. brazili* as quais exibiram atividade citotóxica sobre células Jurkat independentemente da atividade catalítica (Costa *et al.*, 2008). Alguns autores propõem que a atividade citotóxica sobre linhagens celulares tumorais estão associados com indução de apoptose, considerando que as enzimas PLA<sub>2s</sub> possuem um papel importante na apoptose em vários modelos incluindo linhagens celulares (Cummings *et al.*, 2008). A atividade fosfolipásica acelera o turnover dos fosfolipídios, o qual pode influenciar mudanças na membrana que ocorrem durante a apoptose (Panini *et al.*, 2001). Assim, sugerimos maior importância dos resíduos Lys no desenvolvimento do efeito citotóxico da PhTX-I, pois quando ela foi modificada com AA anulou quase completamente esta atividade (Fig. 33).

Vários estudos foram realizados tentando entender os mecanismos envolvidos na resposta inflamatória induzida por PLA<sub>2</sub> miotóxicas de vários venenos de serpentes (Teixeira *et al.*, 2003, 2009; Zuliani *et al.*, 2005). Entretanto, a relação entre as atividades enzimática e edematogênica são contraditórias (Vishwanath *et al.*, 1987). Assume-se que as atividades edematogênica e miotóxica podem ser induzidas por diferentes domínios estruturais nestas toxinas, ou que ocorre uma sobreposição destes domínios (Soares *et al.*, 2004; Zuliani *et al.*, 2005).

A atividade enzimática residual da PhTX-I após sulfonilação dos resíduos de Tyr foi de 38% (Fig. 28). Os resíduos Tyr52 e Tyr73 fazem parte do sítio catalítico das PLA<sub>2</sub>, sendo estes resíduos um suporte estrutural para estabilizar o sistema catalítico. A alteração nesse sistema estaria afetando a atividade catalítica da PhTX-I (Scott *et al.*, 1992). PhTX-I modificada nos resíduos de Tyr diminuiu os efeitos miotóxico e paralisante neuromuscular mais do que sua atividade catalítica, mais uma vez indicando a dissociação dos efeitos farmacológicos e enzimático. Por outro lado a atividade citotóxica de PhTX-I foi drasticamente reduzida após

modificação por NBSF (Fig. 33) sugerindo que os resíduos de Tyr também poderiam estar envolvidos neste efeito. Zhao *et al.*, (1998) observou que as PLA<sub>2</sub> miotóxicas de veneno de serpente apresentam alguns resíduos de Tyr localizados na região C-terminal da molécula. Estas tirosinas podem contribuir à combinação catiônica-hidrofóbica proposta por ter papel importante na miotoxicidade e citotoxicidade (Lomonte *et al.*, 2003; Araya e Lomonte, 2007; Cintra-Francichinelli *et al.*, 2010). PhTX-I apresenta um resíduos de Tyr na sua região C-terminal, a possível alteração deste aminoácido estaria causando a redução da sua toxicidade. Entretanto, a influência da alteração da estrutura secundária induzida pelo tratamento com NBSF não pode ser descartada.

O reagente NPSC diminuiu em 20% a atividade enzimática da PhTX-I nativa (Fig. 28), indicando que os resíduos de Trp modificados não estão relacionados com o sistema catalítico da PhTX-I. Similarmente a modificação de resíduos de Trp não interferiu de maneira significativa no efeito edematogênico e citotóxico da PhTX-I (Figs. 32, 33) e o efeito miotóxico foi mínimamente afetado (Fig. 31). Nesse sentido os resíduos de Trp têm pouca ou nenhuma ação direta sobre o músculo. O efeito paralisante neuromuscular também não foi afetado pelo NPSC (Fig. 29). A modificação de Trp pelo NPSC afetou somente o efeito neurotóxico causado pela PLA<sub>2</sub> MjTX-II de *B. moojeni*, indicando a participação relevante deste resíduo na atividade, sugerindo que a modificação química poderia estar interferindo na estabilidade da interação entre os monômeros desta toxina dimérica, uma vez que o Trp77 ajuda a manter a interação homodimérica. Isto sugere que a mudança da forma dimérica para monomérica desta miotoxina pode reduzir a capacidade de afetar as membranas plasmáticas (Stábeli *et al.*, 2006). Modificação de Trp não alterou o efeito paralisante neuromuscular da PhTX-I, provavelmente devido a ela ser uma enzima monomérica, assim a modificação do Trp não estaria afetando as atividades farmacológicas desta toxina.

Apesar da modificação de aminoácidos específicos não nos ajuda a identificar a região da molécula da PhTX-I responsável pelas diversas atividades farmacológicas, os resultados obtidos são consistentes com o conceito de regiões moleculares separadas as quais determinam as atividades catalíticas e farmacológicas das PLA<sub>2</sub> miotóxicas. E apesar de ser demonstrada uma dissociação parcial, tanto o sítio catalítico como os sítios farmacológicos hipotéticos parecem ser relevantes para o perfil farmacológico da miotoxina PhTX-I.

## 6. CONCLUSÕES.

Os resultados obtidos nos permitem afirmar que PhTX-I e PhTX-II, duas miotoxinas básicas isoladas do veneno de *P. hyoprora*, são PLA<sub>2</sub> D49 básicas monoméricas, as quais exibem as principais ações tóxicas reportadas para esta família de proteínas, incluindo miotoxicidade local *in vivo*, efeito paralisante neuromuscular *ex vivo*, efeitos citolíticos *in vitro*, atividades pró-inflamatórias *in vivo*, possuindo provavelmente um papel principal no envenenamento por esta espécie de serpente.

Embora as proteínas estudadas aqui sejam semelhantes em termos de estrutura-função, a existência desta variabilidade mostra um alto grau de adaptação da serpente ao meio ambiente, com o objetivo de coexistirem com os outros organismos presentes no sistema biológico, cumprindo uma função no fluxo da matéria e energia.

Os resultados sobre modificações químicas na PhTX-I indicam um papel crítico dos resíduos Lys e Tyr na atividade miotóxica, efeito paralisante neuromuscular e principalmente na citotoxicidade induzidas por esta miotoxina. A atividade catalítica da PhTX-I é relevante para os efeitos paralisante neuromuscular, miotóxico e edematogênico, entretanto, a citotoxicidade da PhTX-I é uma atividade completamente independente da sua atividade catalítica. Nossos resultados, portanto, apoiam a hipótese que a atividade catalítica estaria potencializando os efeitos paralisante neuromuscular e miotóxico induzidos pelas PLA<sub>2</sub> de veneno. Apesar de ser demonstrada uma dissociação parcial, tanto o sítio catalítico como os sítios farmacológicos hipotéticos são relevantes para o perfil farmacológico de PhTX-I.



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1860-1, sobre "Avaliação das atividades miotóxica, neurotóxica, citotóxica e inflamatória induzidas por miotoxinas e neurotoxinas fosfolipase A2 isoladas do veneno de *Porthidium hyoprora*", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Sérgio Marangoni / Salomon Huancahuire Vega, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 1º. de junho de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1860-1, entitled "Evaluation of the miotoxic, neurotoxic, cytotoxic and inflammatory activities induced by miotoxic and neurotoxic phospholipases A2 isolated from *Porthidium hyoprora* snake venom", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on June 1, 2009.

Campinas, 1º. de junho de 2009.

Prof. Dr. Stephen Hyslop  
Presidente em exercício

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

## 7. BIBLIOGRAFIA.

- Abreu, V.A., Dal Belo, C.A., Hernandez-Oliveira, S.S., Borja-Oliveira, C.R., Hyslop, S., Furtado, Mde F., Rodrigues-Simioni, L. (2007). Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 148: 142-9.
- Aird, S.D., Kruggel, W.G., Kaiser, II. (1990). Amino acid sequence of the basic subunit of Mojave toxin from the venom of the Mojave rattlesnake (*Crotalus s. scutulatus*). *Toxicon*. 28: 669-73.
- Akira, S. Hirano, T., Taga, T., Kishimoto, T. (1990). Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF) *The FASEB Journal*. 4: 2860-67.
- Andrião-Escarso, S.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Angulo, Y., Díaz-Oreiro, C., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R. (2000). Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> in *Bothrops* snake venoms: effects of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of Bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie*. 82: 755–63.
- Angulo, Y., Lomonte, B., (2005). Differential susceptibility of C2C12 myoblasts and myotubes to group II phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms. *Cell Biochem Funct*. 46: 678-87.
- Angulo, Y., Lomonte, B. (2009). Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*. 54: 949–57.
- Araya, C., Lomonte, B. (2007). Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologues of snake venoms. *Cell Biol Int*. 31: 263-68.
- Arni, R.K., Ward, R.J. (1996). Phospholipase A<sub>2</sub>-A structural review. *Toxicon*. 34: 827–41.
- Arni, R.K.; Ward, R.J.; Gutiérrez, J.M., Tulinsky, A. (1995). Structure of a calcium-independent Phospholipase-like Myotoxic Protein from *Bothrops asper* venom. *Acta Cryst*. D51: 311- 17.
- Avila-Aguero, M.L., Parys, M.M., Hu, S., Peterson, P.K., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Faingezicht, I. (2001). Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. *Ped Emerg Care*. 17: 425–29.
- Babu, A.S., Gowda, T.V. (1994). Dissociation of enzymatic activity from toxic properties of the most basic phospholipase A<sub>2</sub> from *Vipera russelli* snake venom by guanidination of lysine residues. *Toxicon*. 32: 749-52.
- Barbosa, A.M., Amaral, R.O., Teixeira, C.F.P., Hyslop, S., Cogo, J.C. (2003). Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon*. 42: 515–23.
- Barraviera, B., Lomonte, B., Tarkowski, A. (1995). Acute phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. *J Venom Anim Toxins*. 1: 11-22.
- Barros, S.F., Friedlanskaia, I., Petricevich, V.L., Kipnis, T.L. (1998). Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Mediators Inflamm*. 7: 339-46.

- Bazaa, A., Luis, J., Srairi-Abid, N., Kallech-Ziri, O., Kessentini-Zouari, R., Defilles, C., Lissitzky, J.C., El Ayeb, M., Marrakchi, N. (2009). MVL-PLA<sub>2</sub>, a phospholipase A<sub>2</sub> from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. *Matrix Biol.* 28: 188-93.
- Beghini, D.G., Toyama, M.H., Hyslop, S., Sodek, L.C., Novello, C., Marangoni, S. (2000). Enzymatic characterization of a novel phospholipase A<sub>2</sub> from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (Maracambóia) venom. *J Protein Chem.* 19: 679-84.
- Bonfim, V.L., Ponce-Soto, L.A., Novello, J.C., Marangoni, S. (2006). Cytotoxic action in myoblasts and myotubes (C2C12) and enzymatic characterization of a new phospholipase A<sub>2</sub> isoform (Bj-V) from *Bothrops jararacussu* venom. *Protein Pept Lett.* 13: 707-13.
- Bonfim, V.L., Toyama, M.H., Novello, J.C., Hyslop, S., Oliveira, C.R., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S. (2001). Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom. *J Protein Chem.* 20: 239-45.
- Borenfreund, E., Borrero, O. (1984). In vitro cytotoxicity assays. Potential alternatives to the Draize ocular allergy test. *Cell Biol Toxicol.* 1: 55-65.
- Calgarotto, A.K., Damico, D.C., Ponce-Soto, L.A., Baldasso, P.A., Da Silva, S.L., Souza, G.H., Eberlin, M.N., Marangoni, S. (2008). Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A<sub>2</sub> BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon.* 51: 1509-19.
- Calvete, J.J., Sanz, L., Ângulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M. (2009). Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Lett.* 583: 1736-43.
- Campbell, J., Lamar, W., (2004). *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere* 898 pp. Cornell University Press.
- Campos, B.C., Sadahiro, M., dos Santos, M.C., (1999). Epidemiological and clinical aspects of snake accidents in the municipalities of the State of Amazonas, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32: 637-46.
- Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Malaque, C.M.S., Haddad, J.V. (2003). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos animais*. Editora Sarvier 2003.
- Chaves, F., Teixeira, C.F.P., Gutiérrez, J.M., (2006). Role of nitric oxide in the local and systemic pathophysiological effects induced by *Bothrops asper* snake venom in mice *Inflam. Res.* 55: 245-53.
- Cho, W., Kezdy, F.J. (1991). Chromogenic substrates and assay of phospholipases A<sub>2</sub>. *Methods Enzymol.* 197: 75-9.
- Cintra, A.C.O., Marangoni, S., Oliveira, B., Giglio, J.R. (1993). Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *J Protein Chem.* 12: 57-64.
- Cintra-Francischinelli, M., Pizzo, P., Angulo, Y., Gutiérrez, J.M., Montecucco, C., Lomonte, B. (2010). The C-terminal region of a Lys49 myotoxin mediates Ca<sup>2+</sup> influx in C2C12 myotubes. *Toxicon.* 55: 590-96.

- Condrea, E., Fletcher, J.E., Rapuano, B.E., Yang, C.C., Rosenberg, P. (1981). Dissociation of enzymatic activity from lethality and pharmacological properties by carbamylation of lysines in *Naja nigricollis* and *Naja naja atra* snake venom phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon*. 19: 705–20.
- Cornish-Bowden, A., Cardenas, M.L. (1987). Co-operativity in monomeric enzymes. *J. Theor. Biol.* 124: 1-23.
- Corrêa, D.H.A., Ramos, C.H.I. (2009). The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *Afr. J. Biochem.* 3: 164-73.
- Costa, T.R., Menaldo, D.L., Oliveira, C.Z., Santos-Filho, N.A., Teixeira, S.S., Nomizo, A., Fuly, A.L., Monteiro, M.C., de Souza, B.M., Palma, M.S., Stábeli, R.G., Sampaio, S.V., Soares, A.M. (2008). Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. *Peptides*. 29: 1645-56.
- Cummings, J., Hodgkinson, C., Odedra, R., Sini, P., Heaton, S.P., Mundt, K.E., Ward, T.H., Wilkinson, R.W., Growcott, J., Hughes, A., Dive, C. (2008) Preclinical evaluation of M30 and M65 ELISAs as biomarkers of drug induced tumor cell death and antitumor activity. *Mol Cancer Ther.* 7: 455-63.
- Cushman, D.W., Ondetti, M.A. (1991). History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension*. 17: 589–92.
- Dal Belo, C.A., Leite, G.B., Toyama, M.H., Marangoni, S., Pinto, A., Fontana, M., Southana, A., Rowan, E., Hyslop, S., Rodrigues-Simioni, L., (2005). Pharmacological and structural characterization of a novel phospholipase A<sub>2</sub> from *Micrurus dumerilii carinicauda* venom *Toxicon*. 46: 736–50.
- Damico, D.C., da Cruz Hofling, M.A., Cintra, M., Leonardo, M.B., Calgarotto, A.K., da Silva, S.L., Marangoni, S. (2007). Pharmacological study of edema and myonecrosis in mice induced by venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) and its basic Asp49 phospholipase A<sub>2</sub> (LmTX-I). *Protein J.* 27: 384-91.
- Damico, D.C., Lilla, S., de Nucci, G., Ponce-Soto, L.A., Winck, F.V., Novello, J.C., Marangoni, S. (2005). Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp49 phospholipase A<sub>2</sub> isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom. *Biochim Biophys Acta*. 1726: 75-86.
- Damico, D.C.S., Bueno, L.G.F., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S., Cruz-Hofling, M.A., Novello, J.C., (2006). Functional characterization of a basic D49 phospholipase A<sub>2</sub> (LmTX-I) from the venom of the snake *Lachesis muta muta* (bushmaster) *Toxicon*. 47: 759-65.
- Dam-Mieras, M.C., Slotboom, A.J., Pieterse, W.A., de Haas, G.H., (1975). The interaction of phospholipase A<sub>2</sub> with micellar interfaces. The role of the N-terminal region. *Biochemistry*. 14: 5387–94.
- Das, T., Bhattacharya, S., Halder, B., Biswas, A., Das Gupta, S., Gomes, A., Gomes, A. (2011). Cytotoxic and antioxidant property of a purified fraction (NN-32) of Indian *Naja naja* venom on Ehrlich ascites carcinoma in BALB/c mice. *Toxicon*. 57: 1065-72.
- DeLano, W.L. (2002). Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. *Curr Opin Struct Biol.* 12: 14-20.

- Díaz, C., Leon, G., Rucavado, A., Rojas, N., Schroit, A.J., Gutiérrez, J.M. (2001). Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>; role negatively charged phospholipids as potential membrane binding sites. *Arch Biochem Biophys.* 391: 56–64.
- Díaz-Oreiro, C., Gutiérrez, J.M. (1997). Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon.* 35: 241–52.
- Diz Filho, E.B., Marangoni, S., Toyama, D.O., Fagundes, F.H., Oliveira, S.C., Fonseca, F.V., Calgarotto, A.K., Joazeiro, P.P., Toyama, M.H. (2009). Enzymatic and structural characterization of new PLA<sub>2</sub> isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. *Toxicon.* 53: 104-14.
- Ebisui, C., Tsujinaka, T., Morimoto, T., Fujita, J., Ogawa, A., Ishidoh, K., Kominami, E., Tanaka, K., Monden, M. (1995). Changes of proteasomes and cathepsins activities and their expression during differentiation of C2C12 myoblasts. *J. Biochem.* 117: 1088-94.
- Edelhock, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in protein. *Biochemistry.* 6: 1948-54.
- Farsky, S.H., Walber, J., Costa-Cruz, M., Cury, Y., Teixeira, C.F. (1997). Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. *Toxicon.* 35: 185-93.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 246: 64-71.
- Fernandes, C.A.H., Gartuzo, E.C. G., Pagotto, I., Comparetti, E.J., Huancahuire-Veja, S., Ponce-Soto, L.A., Costa, T.R., Marangoni, S., Soares, A.M., Fontes, M.R.M. (2012). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of three myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops brazili* venom. *Acta Cryst.* F68: 935–38.
- Ferreira, T., Camargo, E.A., Ribela, M.T., Damico, D.C., Marangoni, S., Antunes, E., De Nucci, G., Landucci, E.C. (2009). Inflammatory oedema induced by *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom and LmTX-I in the rat paw and dorsal skin. *Toxicon.* 53: 69-77.
- Fletcher, J.E., Hubert, M., Wieland, S., Gong, Q.H., Jiang, M.S., (1996). Similarities and difference in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. *Toxicon.* 34: 1301-11.
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T. (2008). Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxins derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. *Curr Pharm Des.* 13: 2927-34.
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T. (2009). Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *J Proteomics.* 72: 200-9.
- Francis, B.; Gutierrez, J. M., Lomonte, B., Kaiser, I. I. (1991). Myotoxin II from *Bothrops asper* (terciopelo) venom is a lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub>. *Arch. Biochem. Biophys.* 284: 352-59.

- Fuly, A.L., Calil-Elias, S., Zingali, R.B., Guimarães, J.A., Melo, P.A. (2000). Myotoxic activity of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Toxicon*. 38: 961–72.
- Gallacci, M., Oliveira, M., Dal Pai-Silva, M., Cavalcante, W.L., Spencer, P.J. (2006). Paralyzing and myotoxic effects of a recombinant bothropstoxin-I (BthTX-I) on mouse neuromuscular preparations. *Exp Toxicol Pathol*. 57: 239-45.
- Gallacci, M., Cavalcante, W.L.G. (2010). Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologues *Toxicon*. 55: 1–11.
- Garcia Denegri, M.E., Acosta, O.C., Huancahuire-Vega, S., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S., Maruñak, S.L., Teibler, G.P., Leiva, L.C., Ponce-Soto, L.A. (2010). Isolation and functional characterization of a new acidic PLA<sub>2</sub> Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. *Toxicon*. 56: 64-74.
- Gebrim, L.C., Marcussi, S., Menaldo, D.L., de Menezes, C.S., Nomizo, A., Hamaguchi, A., Silveira-Lacerda, E.P., Homsí-Brandeburgo, M.I., Sampaio, S.V., Soares, A.M., Rodrigues, V.M. (2009). Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A<sub>2</sub>-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. *Biologicals*. 37: 222-9.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. (2003). Efeitos Locais no Envenenamento Ofídico na America Latina - Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes *Ed. Sarvier, São Paulo* Cap 32 pp: 310-23.
- Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L. (2003). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*. 42: 915-31.
- Gutiérrez, J.M., Ponce-Soto, L.A., Marangoni, S., Lomonte, B. (2008). Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II Phospholipases A<sub>2</sub>: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA<sub>2</sub> homologue. *Toxicon*. 51: 80-92.
- Gutiérrez, J.M., Theakston, R.D.G., Warrel, D.A. (2006). Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. *Plos Med* 3:150.
- Gutiérrez, J.M., Williams, D., Fan, H.W., Warrell, D.A. (2010). Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*. 56: 1223-35.
- Gutierrez, J.M., Lomonte, B. (1995). Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. 33: 1405-24.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. (1997). Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini, R.M., (Ed.), *Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, England, 321–52.
- Hanada, K., Kinoshita, E., Itoh, M., Hirata, M., Kajiyama, G., Sugiyama, M. (1995). Human pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> stimulates the growth of human pancreatic cancer cell line. *FEBS Lett*. 373: 85-7.
- Harvey, A.L. (1995). From venoms to toxins to drugs. *Chem Ind*. 22: 914–16.

- Harvey, A.L., Barfaraz, A., Thomson, E., Faiz, A., Preston, S., Harris, J.B. (1994). Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks. *Toxicon*. 32: 257–65.
- Heinrikson, R.L., Meredith, S.C. (1984). Amino acid analysis by reverse phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylthiocyanate. *Analytical Biochemistry* 13: p.65-72.
- Higuchi, D.D., Barbosa, C.M.B., Bincoletto, C., Chagas, J.R., Magalhães, A., Richardson, M., Sanchez, E.F., Pesquero, J.B., Araújo, R.C., Pesquero, J.L. (2007). Purification and partial characterization of two phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. *Biochimie*. 89: 319-28
- Ho, C.L., Tsai, I.H., Lee, C.Y. (1986). The role of enzyme activity and charge properties on the presynaptic neurotoxicity and the contracture-inducing activity of snake venom phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon*. 24: 337–45.
- Holland, D.R.; Clancy, L.L.; Muchmore, S.W.; Rydel, T.J.; Einspahr, H. M.; Finzel, B.C.; Heinrickson, R.L., Watenpaugh, K.D. (1990). The crystal structure of a Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the Cottonmouth snake to 2.0 Å resolution. *J. Biol. Chem*. 266: 17649-56.
- Holzer, M., Mackessy, S.P. (1996). An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A<sub>2</sub>. *Toxicon*. 34: 1149-55.
- Huancahuire-Vega, S., Ponce-Soto, L.A., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S. (2011). Biochemical and pharmacological characterization of PhTX-I a new myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Porthidium hyoprora* snake venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 154: 108–19.
- Huancahuire-Vega, S., Ponce-Soto, L.A., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S. (2009). Structural and functional characterization of brazilitoxins II and III (BbTX-II and III), two myotoxins from the venom of *Bothrops brazili* snake. *Toxicon*. 54: 818–27.
- Janssen, M.J.W., van de Wiel, W.A.E.C., Beiboer, S.H.W., van Kampen, M.D., Verheij, H.M. slotboom, A.J., Egmond, M.R. (1999). Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> probed by the variants H48Q, H48N and H48K. *Protein Engineering*, 12: 497-503.
- Kaiser, II., Gutierrez, J.M., Plummer, D., Aird, S.D., Odell, G.V. (1990). The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch Biochem Biophys*. 278: 319-25.
- Kamata, K., Mitsuya, M., Nishimura, T., Eiki, J., Nagata, Y. (2004). Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure* 12: 429-38.
- Kao, P.H., Chen, K.C., Lin, S.R., Chang, L.S. (2008). The structural and functional contribution of N-terminal region and His-47 on Taiwan cobra phospholipase A<sub>2</sub>. *J Pept Sci*.14: 342-8.
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A.R., de Silva, N. (2008). The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med*. 5: 218.

- Kini, R.M. (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Toxicon*. 42: 827-40.
- Kini, R.M. (2005). Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 34: 200-4.
- Kini, R.M., Evans, H.J. (1989). A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon*. 27: 613–35.
- Koh, D.C., Armugam, A., Jeyaseelan, K. (2006). Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci*. 63: 3030-41.
- Krizaj, I., Gubensek, F. (2000). Neuronal receptors for phospholipases A<sub>2</sub> and beta-neurotoxicity. *Biochimie*, 82: 807-14.
- Krizaj, I.; Bieber, A. L.; Ritonja, A., Gubensek, F. (1991). The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Vipera ammodytes* venom. *Eur. J. Biochem*. 202: 1165-68.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-85.
- Lambeau, G., Schmid-Alliana, A., Lazdunski, M., Barhanin, J. (1990). Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A<sub>2</sub> in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 265: 9526–32.
- Landucci, E.C., Toyama, M., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., Antunes, E., de Nucci, G. (2000). Effect of crotopotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon*. 38: 199-208.
- Lewis, R.J., Garcia, M.L. (2003). Therapeutic potential of venom peptides. *Nat Rev Drug Discov*. 2: 790–802.
- Liao, T.H., Ting, R.S., Yeung, J.E. (1982). Reactivity of Tyrosine in Bovine Pancreatic deoxyribonuclease with *p*-Nitrobenzenesulfonyl Fluoride. *The Journal of biological Chemistry*. 257: 5637-44.
- Liu, C.S., Chen, J.M., Chang, C.H., Chen, S.W., Teng, C.M., Tsai, I.H. (1991). The amino acid sequence and properties of edema-inducing Lys-49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. *Biochem. Biophys. Acta*. 1077: 362-70.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón, L. (2003). An overview of Lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*. 42: 885–901.
- Lomonte, B., Moreno, E., Tarkowski, A., Hanson, L.A., Maccarana, M. (1994). Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J Biol Chem*. 269: 29867-73.
- Lomonte., B., Angulo, Y., Rufini, S., Cho, W., Giglio, J.R., Ohno, M., Daniele, J.J., Geoghegan, P., Gutiérrez, J.M. (1999). Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro, *Toxicon*. 37: 145–158.

- Magro, A.J., Fernandes, C.A.H., dos Santos, J.I., Fontes, M.R.M. (2009). Influence of Quaternary Conformation on the Biological Activities of the Asp49-phospholipases A<sub>2s</sub> from Snake Venoms. *Protein Peptide Letters*. 16: 852-59.
- Magro, A.J., Takeda, A.A.S., Soares, A.M., Fontes, M.R.M. (2005). Crystal structure of BthA-I complexed with *p*-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activities. *Acta Crystallogr. D*. 61: 1670-77.
- Maraganore, J.M., Merutka, G., Cho, W., Welches, W., Kezdy, F.J., Heinrickson, R. L. (1984). A new class of phospholipase A<sub>2</sub> with lysine in place of aspartate 49. *J. Biol. Chem.* 259: 13839-43.
- Marchi-Salvador, D.P., Fernandes, C.A., Silveira, L.B., Soares, A.M., Fontes, M.R. (2009). Crystal structure of a phospholipase A<sub>2</sub> homologue complexed with *p*-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. *Biochim Biophys Acta*. 1794: 1583-90.
- Markland, F.S. (1998). Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. 36: 1749-800.
- Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1477: 146-56.
- Mazzi, M.V., Marcussi, S., Carlos, G.B., Stabeli, R.G., Frnco, J.J., Cintra, A.C.O., Franc, S.C., Soares, A.M., Sampaio, S.V. (2004). A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. *Toxicon*. 44: 215–23.
- Meyer, H., Puijk, W.C., Dijkman, R., Foda-van der Hoorn, M.M., Pattus, F., Slotboom, A.J., de Haas, G.H. (1979). Comparative studies of tyrosine modification in pancreatic phospholipases A<sub>2</sub>. Properties of the nitrotyrosyl, aminotyrosyl, and dansylaminotyrosyl derivatives of pig, horse, and ox phospholipases A<sub>2</sub> and their zymogens. *Biochemistry*. 18: 3589–97.
- Milani, R., Jorge, M.T., Ferraz de Campos, F.P., Martins, F.P., Bousso, A., Cardoso, J.L.C., Ribeiro, L.A., Fan, H.W., Franca, F.O.S., Sano-Martins, I.S., Cardoso, D., Fernandez, I.C.O., Fernandes, J.C., Aldred, V.L., Sandoval, M.P., Puerto, G., Theakston, R.D.G., Warrell, D.A. (1997). Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in Sao Paulo state, Brazil. *Q. J. Med.* 90: 323–34.
- Montecucco, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. (2008). Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci*. 65: 2897-912.
- Núñez, V., Arce, V., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. (2004). Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. *Toxicon*. 44: 91-101.
- Otero, R., Gutiérrez, J., Mesa, M.B., Duque, E., Rodríguez, O., Arango, J.L., Gómez, F., Toro, A., Cano, F., Rodríguez, L.M., Caro, E., Martínez, J., Cornejo, W., Gómez, L., Uribe, F.L., Cárdenas, S., Núñez, V., Díaz, A. (2002). Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*. 40: 1107–14.

- Ownby, C.L., Selistre de Araújo, H.S., White, S.P., Fletcher, J.E. (1999). Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins Review. *Toxicon*. 37: 411-45.
- Panini, S.R., Yang, L., Rusinol, A.E., Sinensky, M.S., Bonventre, J.V., Leslie, C.C. (2001). Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol. *J Lipid Res*. 42: 1678-1686.
- Pereañez, J.A., Nuñez, V., Huancahuire-Vega, S., Marangoni, S., Ponce-Soto, L.A. (2009). Biochemical and biological characterization of a PLA<sub>2</sub> from crotoxin complex of *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon*. 53: 534–542.
- Perumal, S.R., Gopalakrishnakone, P., Ho, B., Chow, V.T. (2008). Purification, characterization and bactericidal activities of basic phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Agkistrodon halys* (Chinese pallas). *Biochimie*. 90: 1372-88.
- Petricevich, V.L., Teixeira, C.F., Tambourgi, D.V., Gutiérrez, J.M. (2000). Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*. 389: 1253-66.
- Ponce-Soto, L.A., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J.C., Marangoni, S. (2007). Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochim Biophys Acta*. 770: 585-93.
- Ponce-Soto, L.A., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S. (2010). Neurotoxic, Myotoxic and Cytolytic Activities of the New Basic PLA<sub>2</sub> Isoforms BmjeTX-I and BmjeTX-II Isolated from the *Bothrops marajoensis* (Marajó Lancehead) Snake Venom. *Protein J*. 29: 103-13.
- Ponce-Soto, L.A., Bonfim, V.L., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J.C., Marangoni, S. (2006). Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA<sub>2</sub> D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using in vitro neuromuscular preparation. *Protein J*. 25: 147-55.
- Porto, B.N., Telli, C.A., Dutra, T.P., Alves, L.S., Bozza, M.T., Fin, C.A., Thiesen, F.V., Renner, M.F. (2007). Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon*. 50: 270-7.
- Prasarnpun, S., Walsh, J., Awad, S.S., Harris, J.B. (2005). Envenoming bites by kraits: the biological basis of treatment-resistant neuromuscular paralysis. *Brain*. 128: 2987-96.
- Prianti, A.C.Jr., Ribeiro, W., Lopes-Martins, R.A., Lira-Da-Silva, R.M., Prado-Franceschi, J., Rodrigues-Simioni, L., da Cruz-Höfling, M.A., Leite, G.B., Hyslop, S., Cogo, J.C. (2003). Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick *biventer cervicis* preparations. *Toxicon*. 41: 595-603.
- Qin, S., Pande, A.H., Nemeč, K.N., He, X.M., Tatulian, S.A. (2005). Evidence for the regulatory role of the N-terminal helix of secretory phospholipase A<sub>2</sub> from studies on native and chimeric proteins. *J. Biol. Chem*. 280: 36773–83.
- Qin, S., Pande, A.H., Nemeč, K.N., Tatulian, S.A. (2004). The N-terminal  $\alpha$ - helix of pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> determines productive-mode orientation of the enzyme at the membrane surface. *J. Mol. Biol*. 344: 71–89.

- Randazzo-Moura, P., Ponce-Soto, L.A., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S. (2008). Structural Characterization and Neuromuscular Activity of a New Lys49 Phospholipase A<sub>2</sub> Homologous (Bp-12) Isolated from *Bothrops pauloensis* Snake Venom. *Protein J.* 27: 355-62.
- Rodrigues-Simioni, L., Borgese, N., Ceccarelli, B. (1983). The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. *Neuroscience* 10: 475-89.
- Rigden, D.J., Hwa, L.W., Marangoni, S., Toyama, M.H., Polikarpov, I. (2003). The structure of the D49 phospholipase A<sub>2</sub> piratoxin III from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: possible relationship to cooperative substrate binding. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 59: 255-62.
- Rodrigues-Simioni, L., Zamunér, S.R., Cogo, J.C., Borja-Oliveira, C.R., Prado-Franceschi, J., da Cruz-Höfling, M.A., Corrado, A.P. (2004). Pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). *Toxicon.* 43: 633-8.
- Romero-Vargas, F.F., Ponce-Soto, L.A., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S. (2010). Biological and biochemical characterization of two new PLA<sub>2</sub> isoforms Cdc-9 and Cdc-10 from *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 151: 66-74.
- Rosenberg, P., Ghassemi, A., Condrea, E., Dhillon, D., Yang, C.C. (1989). Do chemical modifications dissociate between the enzymatic and pharmacological activities of beta bungarotoxin and notexin? *Toxicon.* 27: 137-59.
- Rucavado, A., Lomonte, V., Obadia, M., Gutierrez, J.M. (1995). Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. *Exp Mol Pathol.* 63: 186-99.
- Rufini, S., Cesaroni, M., Balestro, N., Luly, P. (1996). Proliferative effect of ammodytin L from the venom of *Vipera ammodytes* on 208F rat fibroblasts in culture. *Biochem J.* 320: 467-72.
- Schaloske, R.H., Dennis, E.A. (2006). The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta.* 1761: 1246-59.
- Scott, D.L., Achari, A., Vidal, J.C., Sigler, P.B., (1992). Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. *J. Biol. Chem.* 267: 22645-57.
- Scott, D.L., Otwinowski, Z., Gelb, M.H., Sigler, P.B. (1990). Crystal structure of bee-venom phospholipase A<sub>2</sub> in a complex with a transition-state analogue. 250: 1563-6.
- Selistre de Araújo, H.S., White, S.P., Ownby, C.L., (1996). Sequence analysis of Lys 49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins: a highly conserved class of protein. *Toxicon.* 34: 1237-42.
- Shina, R., Yates, S.L., Ghassemi, A., Rosenberg, P., Condrea, E. (1990). Inhibitory effect of EDTA. Ca<sup>2+</sup> on the hydrolysis of synaptosomal phospholipids by phospholipase A<sub>2</sub> toxins and enzymes. *Biochem Pharmacol.* 40: 2233-9.
- Singh, G., Gourinath, S., Sharma, S., Paramasivam, M., Srinivasan, A., Singh, T.P. (2001). Sequence and crystal structure determination of a basic phospholipase A<sub>2</sub> from common krait

- (*Bungarus caeruleus*) at 2.4 Å resolution: identification and characterization of its pharmacological sites. *J Mol Biol.* 307: 1049-59.
- Six, D.A., Dennis, E.A., (2000). The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta.* 1488: 1-19.
- Soares, A.M., Andrião-Escarso, S.H., Bortoleto, R.K., Rodrigues-Simioni, L., Arni, R.K., Ward, R.J., Gutierrez, J.M., Giglio, J.R., (2001a). Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops pirajai* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 387: 188–96.
- Soares, A.M., Giglio, J.R.. (2003). Chemical modifications of phospholipases A<sub>2</sub> from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. *Toxicon.* 42: 855-68.
- Soares, A.M., Guerra-Sá, R., Borja-Oliveira, C.R., Rodrigues, V.M., Rodrigues-Simioni, L., Rodrigues, V., Fontes, M.R., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R. (2000a). Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. *Arch Biochem Biophys.* 378: 201-9.
- Soares, A.M., Andrião-Escarso, S.H., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Marangoni S., Toyama, M.H., Arni, R.K., Giglio, J.R. (2000b). Structural and functional characterization of a myotoxin I from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 373: 7– 15.
- Soares, A.M., Mancin, A.C., Cecchini, A.L., Arantes, E.C., Franca, S.C., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R., (2001b). Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A<sub>2</sub> subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33: 877–88.
- Soares, A.M., Sestito, W.P., Marcussi, S., Stábéli, R.G., Andrião-Escarso, S.H., Cunha, O.A., Vieira, C.A., Giglio, J.R. (2004). Alkylation of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 258-70.
- Stábéli, R.G., Amui, S.F., Sant'Ana, C.D., Pires, M.G., Nomizo, A., Monteiro, M.C., Romão, P.R., Guerra-Sá, R., Vieira, C.A., Giglio, J.R., Fontes, M.R., Soares, A.M. (2006) *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 142: 371-81.
- Takasaki, C., Sugama, A., Yanagita, A., Tamiya, N., Rowan, E.G., Harvey A.L. (1990). Effects of chemical modifications of Pa-11, a phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of australian king brown snake (*Pseudechis australis*), on its biological activities. *Toxicon.* 28: 107-17.
- Teixeira, C.F.P., Landucci, E.C.T., Antunes, E., Chacur, M., Cury, Y. (2003). Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon.*42: 947–62.
- Teixeira, C., Cury, Y., Moreira, V., Picolob, G., Chaves, F. (2009). Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon.* 54: 988-97.
- Toyama, Dde O., Diz Filho, E.B., Cavada, B.S., da Rocha, B.A., de Oliveira, S.C., Cotrim, C.A., Soares, V.C., Delatorre, P., Marangoni, S., Toyama, M.H. (2011). Umbelliferone induces

- changes in the structure and pharmacological activities of Bn IV, a phospholipase A<sub>2</sub> isoform isolated from *Bothrops neuwiedi*. *Toxicon*. 57: 851-60.
- Verhei, H.M., Slotboom, A.J., de Haas, G.H. (1981). Structure and function of phospholipase A<sub>2</sub>. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 91: 91–203.
- Verheij, H.M., Vowerk, J.J., Jasen, E.H.J.M., Puyk, W.C., Dýkstra, B.W., Drenth, J., Hass G.H. (1980). Methylation of Histidine-48 in pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>, role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry*. 19:743-48.
- Vishwanath, B.S., Kini, R.M., Gowda, T.V. (1987). Characterization of three edema inducing phospholipase A<sub>2</sub> enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. *Toxicon*. 25: 501–9.
- Ward, R.J., Monesi, N., Arni, R.K., Larson, R.E., Paço-Larson, M.L. (1995). Sequence of a cDNA encoding bothropstoxin I, a myotoxin from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Gene*. 156: 305-6.
- Ward, R.J., de Azevedo, W.F.Jr., Arni, R.K. (1998). At the interface: crystal structures of phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon*, 36: 1623-33.
- Warrell, D.A. (2005). Treatment of bites by adders and exotic venomous snakes. *BMJ*. 21: 332 (7534): 151.
- Yang, C.C. (1994). Structure-function relationship of phospholipase A<sub>2</sub> from snake venoms. *J.Toxicol.* 13: 125-77.
- Yang, C.C. (1997). Chemical modification and functional sites of phospholipases A<sub>2</sub>. In: Kini, R.M., (Ed.), *Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, pp. 185–204.
- Yang, C.C., Chang, L.S. (1991). Dissociation of lethal toxicity and enzymic activity of notexin from *Notechis scutatus scutatus* (Australian-tiger-snake) venom by modification of tyrosine residues. *Biochem. J.* 280: 739–44.
- Yang, C.C., Huang, C.S., Lee, H.J. (1985). Studies on the status of tyrosyl residues in phospholipases A<sub>2</sub> from *Naja naja atra* and *Naja nigricollis* snake venom. *J. protein Chem.* 4: 87.
- Yu, B.Z., Berg, O.G., Jain, M.K. (1993). The divalent cation is obligatory for the binding of ligands to the catalytic site of secreted phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochemistry*. 32: 6485-92.
- Zhao, H., Tang, L., Wang, X., Zhou, Y., Lin, Z. (1998). Structure of a snake venom phospholipase A<sub>2</sub> modified by *p*-bromo-phenacyl-bromide. *Toxicon*. 36: 875-86.
- Ziolkowski, C., Bieber, A.L. (1992). Mojave toxin affects fusion of myoblasts and viability of myotubes in cell cultures. *Toxicon*. 30: 733-44.
- Zuliani, J.P., Fernandez, C.M., Zamuner, S.R., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F., (2005). Inflammatory events induced by Lys 49 and Asp49 phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic. *Toxicon*. 45: 335-46.