# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

## INSTITUTO DE BIOLOGIA



## SALOMON HUANCAHUIRE VEGA

# "MIOTOXINAS PLA<sub>2</sub> D49 E K49 DO VENENO TOTAL DE Bothrops brazili. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

## **ESTRUTURAL E FUNCIONAL**"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) VEGA OMON e aprovoda pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Sergio Marangoni Co-Orientador: Prof. Dr. Luis Alberto Ponce Soto

Campinas, 2009

#### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

V522m	<ul> <li>Vega, Salomon Huancahuire</li> <li>Miotoxinas PLA<sub>2</sub> D49 e K49 do veneno total de <i>Bothrop</i> brazili: purificação e caracterização estrutural e funcional / Salomon Huancahuire Vega. – Campinas, SP: [s.n.], 2009</li> </ul>	
	Orientadores: Sergio Marangoni, Luis Alberto Ponce Soto. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.	
	<ol> <li>Bothrops brazili.</li> <li>Miotoxina.</li> <li>Edema.</li> <li>Fosfolipase A<sub>2</sub>.</li> <li>Veneno - Purificação.</li> <li>Marangoni,</li> <li>Sergio.</li> <li>Ponce-Soto, Luis Alberto.</li> <li>Universidade</li> <li>Estadual de Campinas.</li> <li>Instituto de Biologia.</li> <li>IV.</li> <li>Título.</li> </ol>	
	(rcdt/ib)	

**Título em inglês:** PLA<sub>2</sub> D49 and K49 mitoxins from the venom of Bothrops brazili snake: purification and structural and functional characterization.

Palavras-chave em inglês: Bothrops brazili; Myotoxin; Edema; Phospholipase A<sub>2</sub>; Venom - Purification.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Sergio Marangoni, Humberto Santos Neto, Paulo Granjeiro. Data da defesa: 26/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 26 de Fevereiro de 2009

#### **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Sergio Marangoni (Orientador(a))

Vi Clampan

Prof. Dr. Humberto Salas Neto

Prof. Dr. Paulo Granjeiro

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Prof(a). Dr(a). Carolina Borja

Assinatura Assinatura Keinon anne C 2 to Assinatura

Assinatura

A Deus pela vida e por me acompanhar sempre!!! "Tudo posso naquele que me fortalece" (FP 4.13)

Aos meus pais Eduardo e Elena pela confiança, dedicação, carinho e amor que sempre me deram. Pela paciência nos momentos difíceis, pelos seus esforços incentivos e apóio nessa jornada. Muito obrigado por tudo!!! Amo vocês!!!

As minhas queridas irmãs Carmen, Liz, Ruth e Helencita pelo carinho, amor e paciência nestes anos de separação, porque minha vida perto de vocês é mais feliz. Muito obrigado por tudo!!! Amo vocês!!!

#### Agradecimentos

A Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A meu orientador, Prof. Dr. Sergio Marangoni, Prof. Titular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia (UNICAMP), pela orientação, amizade, apoio e incentivo em todos os momentos da realização desse trabalho. Agradeço a oportunidade que me foi dada.

Ao meu co-orientador Dr. Luis Alberto Ponce Soto pela amizade, confiança e incentivo durante todo esse período, pelas sugestões e discussões do trabalho. Sou grato aos ensinamentos de vida e aos científicos transmitidos.

Aos professores da Banca: Prof Dr. Hiroshi Aoyama, Prof. Dr. Paulo Afonso Granjeiro, pela presença, sugestões, correções e por contribuírem com a melhora do trabalho.

Ao Paulo Baldasso pela amizade e ajuda fundamental nos experimentos realizados e necessidades durante todo o projeto.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Química de Proteínas (LAQUIP), Verinha, Ana Paula, Vanessa, Desire, Frey, Frank e Augusto, pelas suas amizades, convivência, paciência e pelos momentos felizes e descontraídos. Muito obrigado!!

Aos meus amigos do grupo GEA, pelos quais tenho total admiração e carinho. Muito obrigado pelas suas amizades, atenção, carinho, pelos momentos agradáveis e inesquecíveis e pelo apoio nessa caminhada. Valeu galera!!

A todos os amigos que contribuíram e me acompanharam durante este trabalho.

Aos professores, técnicos, funcionários e alunos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

# Índice

A 1-		a	Pág
A0	reviaç	:0es	VIII 
Ke	sumo.		1X
AD	stract.		X1
I.	INIF		01
	1.1	Serpentes, veneno e seus componentes	01
	Acidente ofidico	02	
	1.3	Veneno botrópico	03
		1.3.1 Atividade hemorrágica	04
		1.3.2 Atividade coagulante e agregação plaquetária	04
		1.3.3 Atividade inflamatória	04
		1.3.4 Mionecrose	05
	1.4	Bothrops brazili	07
	1.5	Fosfolipases A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> )	10
		1.5.1 Ação biológica das PLA <sub>2</sub>	12
		1.5.2 PLA <sub>2</sub> miotóxicas	16
		1.5.3 Neurotoxinas	19
		1.5.3.1 Neurotoxinas pré-sinápticas	19
		1532 Neurotoxinas pós-sinápticas	20
	16	Ferramentas moleculares	20
2	OBI	TIVOS	$\frac{20}{22}$
3	MAT	TRIAIS E MÉTODOS	23
5.	31	Veneno e reagentes	$\frac{23}{23}$
	3.1	A nimais	23
	3.2	Purificação do veneno total de Rothrons hrazili	$\frac{23}{23}$
	5.5	2 2 1 Cramatografia de avalusão molocular em columo de Sanhadov G 75	$\frac{23}{22}$
		2.2.2. LIDL C de fece reverse	23
	2.4	5.5.2 HPLC de lase levelsa.	23
	3.4	Caracterização físico-química das $PLA_2$ isoladas de veneno de <i>B. brazili</i>	24
		3.4.1 Eletroiorese em PAGE-SDS.	24
		3.4.2 Espectrometria de massas por MALDI-IOf	24
		3.4.3 Determinação da atividade fosfolipásica (PLA <sub>2</sub> )	25
		3.4.4 Estudos cinéticos da $PLA_2$ D49 isolada de veneno de <i>B. brazili</i>	25
		3.4.4.1 Efeito do pH na atividade PLA <sub>2</sub>	25
		3.4.4.2 Efeito da temperatura na atividade PLA <sub>2</sub>	25
		3.4.4.3 Efeito da concentração de substrato na atividade PLA <sub>2</sub>	25
		3.4.4.4 Efeito de íons divalentes na atividade PLA <sub>2</sub>	25
		3.4.5 Análise de composição de aminoácidos	26
		3.4.6 Determinação da estrutura primária (seqüenciamento)	26
		3.4.6.1 Redução e carboximetilação	26
		3.4.6.2 Digestão enzimática e purificação dos fragmentos peptídicos	26
		3.4.7 Estudo da seqüência N-terminal e homologia.	26
	3.5	Caracterização biológica das PLA <sub>2</sub> K49 e PLA <sub>2</sub> D49 isoladas de veneno de <i>B. brazili</i>	27
		3.5.1 Atividade Miotóxica	27
		3.5.2 Atividade Edematogênica	27
		3.5.3 Atividade neurotóxica em preparação muscular <i>biventer cervicis</i> de nintainho	28
		354 Determinação da dose letal meia (DL <sub>50</sub> ) via intracerebroventricular	$\frac{-0}{28}$
	36	Análise estatística	$\frac{-3}{29}$

4.	RES	ULTADOS					
	4.1	Purificação da fração BbIII a partir do veneno de B. brazili, em cromatografia de					
		exclusão molecular Sephadex G-75					
	4.2	Purificação das frações BbTX-I, BbTX-II, BbTX-III e BbTX-IV a partir da fração					
		BbIII em HPLC de fase reversa					
	4.3	.3 Re-cromatografia em HPLC de fase reversa das frações BbTX-I, BbTX-II, BbTX-II					
		BbTX-IV isoladas do veneno de <i>B. brazili</i>					
	4.4	Eletroforese em SDS-PAGE das frações BbTX-I, BbTX-II, BbTX-III e BbTX-IV					
		isoladas do veneno de <i>B. brazili</i>					
	4.5	Determinação das massas moleculares por Espectrometria de Massas (MALDI-TOf)					
		das frações BbTX-I, BbTX-II, BbTX-III e BbTX-IV de <i>B. brazili</i>					
	4.6	Determinação da atividade PLA <sub>2</sub> do veneno total, e as frações BbTX-I, BbTX-II,					
		BbTX-III e BbTX-IV do veneno de <i>B. brazili</i>					
	4.7	Estudos da cinética enzimática da fração BbTX-III isolada do veneno total de B.					
		brazili					
		4.7.1 Efeito do pH na atividade enzimática da fração BbTX-III					
		4.7.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática da fração BbTX-III					
		4.7.3 Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática da fração BbTX- III					
		474 Determinação de K <sub>m</sub> e V <sub>mar</sub> a partir do gráfico duplo recíproco de Lineawever-					
		Burk da fração BbTX-III					
		475 Efeito dos íons divalentes na atividade enzimática da fração BbTX-III 40					
	4.8	Análise de composição de aminoácidos das frações BbTX-II e BbTX-III isoladas do					
		veneno de <i>B. brazili</i>					
	4.9	Estudo de sequência e homologia das frações BbTX-II e BbTX-III isoladas do veneno					
	4 10	42					
	4.10	Caracterização biológica da PLA <sub>2</sub> K49 Bb1X-II e da PLA <sub>2</sub> D49 Bb1X-III isoladas do					
		44					
		4.10.1 Atividade miotoxica local <i>in vivo</i> de BDIX-II e BDIX-III atraves da					
		44 determinação dos niveis de CK plasmaticos					
		4.10.2 Atividade miotoxica sistemica <i>in vivo</i> de Bolx-II e bolx-III atraves da					
		45 410.2 Determinação dos niveis de CK plasmaticos					
		4.10.5 Determinação da atividade edematogenica da $PLA_2$ K49 BD1X-II e da $PLA_2$					
		D49 BD1X-III Isoladas do veneno de B. brazul 40					
		4.10.4 Determinação da atividade neurotoxica <i>în vitro</i> da PLA <sub>2</sub> K49 BD1X-II e da					
		4/10.5 Determinação do DL via introcorrebroventricular (i.e.v.) do DLA V40 DhTV					
		4.10.5 Determinação da $DL_{50}$ via intraceletoroventricular (1.c.v.) da $PLA_2$ K49 B01A-					
5	סות	$11 \text{ e ua } \Gamma LA_2 D49 \text{ B01 } \Lambda \text{-}111 \text{ isoladas uo velieno de } D. Druzui$					
5.	5 1	Joshan - 47 Jeolomonto o murificação das DIA, KAO DATY Lo DATY II o as DIA, DAO DATY III					
	5.1	e BbTY IV do veneno de R brazili					
	52	$\psi$ DUIA-IV du Vellello de <i>D. Druziu</i>					
	5.2	isoladas do veneno de <i>B</i> brazili					
	53	Caracterização hiológica da PLA, KAO BETY II e da PLA, DAO BETY III isoladas do					
	5.5	veneno de R brazili					
6	CON	Veneno de D. Orazin					
0. 7		IEVO 03					
7. 8	RIRI	NLAU					
0							

vii

## Abreviações

PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
kDa	Kilodaltons
MALDI TOf	Ionozação/dessorção de matriz assistida por laser – tempo de vôo
pI	Ponto isoelétrico
СК	Creatina-quinase
AMBIC	Bicarbonato de amônio
rpm	Revoluções por minuto
PDA 991	Photodiode Array Detector
PBS	Tampão fosfato de sódio
TFA	Ácido trifluoracético
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SDS	Dodecil sulfato de sodio
DTT	Ditiotreitol
Tris	Tris (Hidroximetil) aminometano
Tampão A	TFA 0,1% utilizado para cromatografia de HPLC
Tampão B	Acetonitrila 66% utilizado em cromatografia de HPLC
mA	Miliampere
NOAB	Substrato cromogênico ácido 4-nitro-(3-octanoil) benzóico

#### Resumo

As enzimas PLA<sub>2</sub> provenientes de veneno de serpentes são intensamente estudadas devido a que os envenenamentos constituem um dos principais problemas de saúde em muitos paises. Por outro lado, estas toxinas ajudam a revelar aspectos desconhecidos da fisiologia celular e tisular.

Neste trabalho, apresentamos a purificação e a caracterização bioquímica e farmacológica de duas miotoxinas fosfolipases A<sub>2</sub>: BbTX-II e BbTX-III, a partir de veneno de *Bothrops brazili*. As duas proteínas foram isoladas e purificadas usando um procedimento simples e rápido envolvendo duas etapas cromatográficas, exclusão molecular em Sephadex G-75 e HPLC de fase reversa (C18). A eletroforese de ambas miotoxinas mostrou massas relativas em torno de 13 e 27 kDa (para monômeros e dímeros respectivamente). Espectrometria de massa por MALDI-TOf confirmou a pureza das proteínas e mostrou que possuem massas moleculares em torno de 13,8 kDa. A análise de aminoácidos mostrou alto conteúdo de aminoácidos básicos e hidrofóbicos, assim como 14 resíduos de Cys.

BbTX-III apresentou atividade PLA<sub>2</sub> na presença de um substrato cromogênico, mostrando comportamento sigmoidal, principalmente à baixas concentrações. Atividade máxima foi alcançada em pH 8 e entre 35–45 °C. BbTX-III mostrou-se completamente dependente de Ca<sup>2+</sup> e, na presença dos íons Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>, a atividade enzimática foi reduzida a níveis similares aos observados na ausência de Ca<sup>2+</sup>.

A análise de composição de aminoácidos mostrou alta presença de Lys, His e Arg (pI 8,46). A presença de 14 resíduos de cisteína sugere a formação de 7 pontes dissulfeto. O estudo de homologia da seqüência da PLA<sub>2</sub> BbTX-III mostrou que existem posições extremamente conservadas nas PLA<sub>2</sub>. S(1), L(2), E(4) 7 a 10 (QMIL), Y(21). Os resíduos conservados Y(28), G(30), G(32), D(49), H(48) e Y(52) estão direta ou indiretamente ligados com a catálise. Além disso, BbTX-III apresentou algumas mutações: K(35) -> G(35), R(51) -> Y(51) e D(118) -> A(118) que estão estrategicamente posicionadas para a expressão da atividade catalítica. Apesar destas substituições, as atividades farmacológicas e a atividade catalítica são mantidas.

O efeito neurotóxico de BbTX-III foi analisado *in vitro* na preparação neuromuscular *biventer cervicis* de pintainhos. O resultado mostrou que a toxina é menos potente quando comparada com venenos crotálicos. BbTX-III demonstrou efeito miotóxico local *in vivo* através da liberação de creatina quinase (CK) e, efeito inflamatório, através de edema de pata. Como a BbTX-III produziu forte efeito inflamatório, a hidrólise de fosfolipídios poderia ser relevante neste fenômeno.

BbTX-II foi caracterizada como uma PLA<sub>2</sub> K49 (cataliticamente inativa) em função das características físico-químicas evidenciadas: massa de 13,68 kDa, 121 resíduos de aminoácidos, caráter básico (*pI* 8.73) e alto grau de homologia seqüencial na sua estrutura primária, quando comparada com outras PLA<sub>2</sub> K49 procedentes de veneno de serpentes botrópicas. O alinhamento com outras seqüências completas de PLA<sub>2</sub> K49 mostrou a presença de algumas mutações importantes. Assim, as substituições Y $\rightarrow$ N(27), N $\rightarrow$ P(58) e L $\rightarrow$ F(114) não modificaram os efeitos biológicos aqui estudados, revelando que poderiam estar relacionados com outras atividades. Os resíduos N(28), K(111), L(32) poderiam contribuir com a interrupção da catálise.

Esta nova PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II mostrou miotoxicidade local *in vivo*, atividade inflamatória e letalidade, corroborando que se enquadra dentro da família de proteínas PLA<sub>2</sub> K49. Os estudos de neurotoxicidade revelaram um efeito neurotóxico *in vitro* na preparação *biventer cervicis* de pintainho (20 µg/ml).

BbTX-II e BbTX-III mostraram ser miotoxinas com atividade edematogênica e neurotóxica, independentemente de apresentarem atividade catalítica (BbTX-III) ou não (BbTX-II) Apoiando a existência de regiões moleculares distintas à catalítica responsáveis pelos efeitos farmacológicos. Os efeitos farmacológicos da toxina BbTX-III (PLA<sub>2</sub> D49) provavelmente tenham uma estrita relação entre a atividade enzimática e a ligação da toxina com micro-domínios na membrana plasmática onde sua atividade seja maximizada e cause danos relevantes na organização da membrana. No caso da BbTX-II (PLA<sub>2</sub> K49) possivelmente a combinação de aminoácidos aromáticos/hidrofóbicos e positivamente carregados da região C-terminal seja a responsável de alterar a integridade da membrana plasmática.

#### Abstract

The enzymes  $PLA_2$  coming of venom snake are studied intensely due to that the poisonings constitute one of the main problems of health in many countries. On the other hand, these toxins help to reveal unknown aspects of the cellular and tissue physiology.

In this work, we presented the purification and biochemical and pharmacological characterization of two myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>: BbTX-II and BbTX-III from *Bothrops brazili* venom. The two proteins were isolated and purified using a simple and fast procedure involving two chromatographic steps, molecular exclusion in Sephadex G-75 and reverse-phase HPLC (C-18 column). Both myotoxins showed around 13 and 27 kDa (for monomers and dimers, respectively) relative mass. MALDI-TOf mass spectrometry confirmed the purity of the proteins showing molecular masses around 13,8 kDa. Amino acid analysis showed a high content of hydrophobic and basic amino acids as well as 14 cysteine residues.

BbTX-III presented PLA<sub>2</sub> activity in the presence of a chromogenic substrate, showing sigmoidal behavior, mainly at low concentrations. Maximum PLA<sub>2</sub> activity was reached at pH 8 and 35-45 °C. Maximum activity required Ca<sup>2+</sup> and, in the presence of Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>, was reduced at similar levels as observed in the absence of Ca<sup>2+</sup>.

Amino acids analysis of composition showed high presence of Lys, His and Arg (*pI* 8,46). The presence of 14 cystein residues suggested the formation of 7 disulfide bridges. Sequence homology of the PLA<sub>2</sub> BbTX-III revealed positions extremely conserved in PLA<sub>2</sub> S(1), L(2), E(4) 7 to 10 (QMIL), Y(21). The conserved residues Y(28), G(30), G(32), D(49), H(48) and Y(52) are direct or indirectly linked to the catalysis. Besides, BbTX-III presented some mutations: K(35) -> G(35), R(51) -> Y(51) and D(118) -> A(118) that are strategically positioned for the expression of catalytic activity. Despite these substitutions, the pharmacological and catalytic activities are maintained.

The neurotoxic effect of BbTX-III was analyzed *in vitro* at chick biventer cervicis muscle preparation. Our results showed that the blockage of the muscle contraction was lower when compared with crotalic venoms. BbTX-III demonstrated *in vivo* myotoxic local effect through the liberation of creatine kinase (CK) and inflammatory effect through paw edema. As BbTX-III produced strong inflammatory effect, the phospholipids hydrolysis could be relevant in this phenomenon.

BbTX-II was characterized as PLA<sub>2</sub> homologous K49 (catalytically inactive), because its chemical and physical evidenced characteristics: mass of 13,68 kDa, 121 amino acids residues, basic character (pI 8.73) and high sequential homology in its primary structure, when compared with other PLA<sub>2</sub> K49 from venom of Botrhops serpents. The alignment with other complete

sequences of PLA<sub>2</sub> homologous K49 showed the presence of some important mutations. Substitutions Y->N(27), N->P(58), and L->F(114) did not modify the biological activities here studied, revealing that it could be related to other activities. The residues N(28), K(111), L(32) could contribute with the interruption of the catalysis.

This new PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II showed *in vivo* myotoxic local effect, inflammatory and lethality activities, evidencing it was fitted to the family of proteins PLA<sub>2</sub> K49 homologous. Beside BbTX-II revealed *in vitro* neurotoxyc effect at chick biventer cervicis muscle preparation (20  $\mu$ g/mL).

BbTX-II and BbTX-III showed to be myotoxins to activity edematogenic and neurotoxyc independently of present catalytic activity (BbTX-III) or no (BbTX-II) Supporting the existence of molecular areas different to the catalytic responsible for the pharmacological effects. The pharmacological effects of the toxin BbTX-III (PLA<sub>2</sub> D49) they probably have a strict relationship between the enzymatic activity and binding of the toxin with micro-domains in the plasmatic membrane where the activity is maximized and cause relevant damages in the organization of the membrane. In the case of the BbTX-II (PLA<sub>2</sub> K49) possibly the combination of amino acids aromatics/hidrophobics and positively loaded of the area C-terminal it is the responsible of altering the integrity of the plasmatic membrane.

## 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 Serpentes, veneno e seus componentes.

As serpentes foram uma questão de fascinação, medo e mitos ao longo da história. No Egito Antigo, foi adorada a naja e sua réplica era usada para decorar as coroas dos imperadores romanos. No mundo grego antigo, o deus da medicina (Esculápio) vestia a roupagem de uma vara cruzada com uma serpente, símbolo que ainda é utilizado para representar a Medicina.

As serpentes ou ofídios são popularmente conhecidas como cobras e compõem a subordem Serpentes que, atualmente, com cerca de 2930 espécies, é a segunda em abundância de espécies, depois de Sáuria (lagartos e lagartixas), com 4636 espécies. Serpentes e Sáuria formam a Ordem Squamata, o principal, mais numeroso e moderno grupo dos répteis viventes. (Uetz P. The EMBL reptile database 2002).

O Brasil possui uma riquíssima fauna de serpentes, muitas delas ainda mal conhecidas ou pouco estudadas, embora essa situação venha se modificando nos últimos anos. São cerca de 265 espécies, classificadas dentro de 73 gêneros, reunidos em 9 famílias. De todas estas, somente as famílias Elapidae e Viperidae congregam as espécies peçonhentas, isto é, aquelas que produzem toxinas (veneno) em glândulas especializadas e tem aparelhos apropriados para inoculá-las.

O veneno das serpentes é uma mistura complexa de proteínas, nucleotídeos e íons inorgânicos. De acordo com Kini (2003), entre os compostos inorgânicos, estão cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio manganês sódio fósforo cobalto e zinco; outros componentes presentes no veneno incluem carboidratos (glicoproteínas), lipídeos (fosfolipídios), aminas biogênicas, aminoácidos e nucleotídeos. Entretanto, a maior parte dos compostos presentes no veneno de serpente é formada por proteínas, correspondendo a cerca de 90% a 95% do peso seco do veneno (Tu, 1996).

Entre as proteínas do veneno, estão as chamadas proteases, que apresentam atividade enzimática, tendo as proteínas da presa como substrato. Os principais exemplos de proteases presentes nos venenos são as metaloproteases e as serinoproteases. Entretanto, vários outros tipos de proteínas são encontrados nos venenos, tais como fosfolipases, fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, L-amino oxidases, catalases, ATPases, hialuronidases, NAD nucleosidases e L-glicosaminidases (Matsui *et al.*, 2000). Esta combinação de peptídeos e polipeptídeos fazem com que o veneno apresente diferentes propriedades tóxicas.

#### **1.2** Acidente ofídico.

Os acidentes ofídicos têm importância médica em virtude de sua grande freqüência e gravidade. Anualmente, ao redor de 2,5 milhões de pessoas no mundo são vítimas de picada de serpente, das quais 100.000 chegam a perder a vida. A maior parte da morbidade e mortalidade ocorre comumente nos países pobres de regiões tropicais e subtropicais. As conseqüências dos envenenamentos ofídicos nestes países não têm recebido a devida atenção, deixando de ser registradas estatisticamente como casos de saúde e sendo, na maioria das vezes, tratadas com metodologias ultrapassadas e com procedimentos não efetivos (Gutiérrez, *et al.*, 2006).

No Brasil, entre os anos de 2000 a 2002, foram notificados pela Fundação Nacional de Saúde –Ministério da Saúde (FUNASA - Ministério da Saúde) 81.611 casos de acidentes por serpentes, o que representa aproximadamente 20.000 casos / ano no país. Estatisticamente, o veneno botrópico é o que apresenta os maiores índices de notificações em âmbito nacional, porém em letalidade representa apenas 0,31%; já o veneno crotálico pode, pelas análises epidemiológicas, ser considerado o mais importante (Tabela 1).

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

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

Na América Latina, os envenenamentos por viperidios caracterizam-se por uma fisiopatologia complexa, que inclui efeitos locais (neurotoxicidade, mionecrose, dermonecrose, hemorragia, edema e dor) e, em casos moderados e severos, alterações sistêmicas como coagulopatias, sangria, choque cardiovascular e insuficiência renal aguda (Ponce-Soto *et al.,* 2007b). Provavelmente, à exceção a esse padrão fisiopatológico encontre-se no caso de algumas cascavéis sul-americanas, especialmente a *Crotalus durissus terrificus*, cujo veneno induz a alterações locais irrelevantes, caracterizando-se bem mais por potentes atividades neurotóxicas e miotóxicas sistêmicas do que por alterações renais e de coagulação (Fan e Cardoso, 1995). Os venenos das serpentes corais (*Micrurus* sp) e da serpente marinha *Pelamis platurus* (família Hydrophiidae) induzem unicamente um efeito neurotóxico, sem ocasionar alterações locais relevantes, do ponto de vista clínico (Gutierrez, 1995). Experimentalmente, tem-se evidenciado que

os venenos das serpentes corais induzem um efeito miotóxico em camundongos (Gutierrez *et al.,* 1992), embora este efeito não pareça ser relevante no envenenamento humano.

As alterações locais induzidas por venenos de viperidios constituem um problema relevante por várias razões:

a) Desencadeiam-se rapidamente após a inoculação do veneno, o que dificulta a neutralização, se o antiveneno for administrado várias horas depois do acidente.

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

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

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

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

O veneno, assim como seus componentes, age em distintos pontos do organismo, baseado em suas proteínas com ação neurotóxica, proteolítica, curarizante. No mesmo veneno, por exemplo, temos proteínas coagulantes e anticoagulantes, cujos mecanismos de ação são antagônicos, mas seus efeitos são somatórios. Essas diferentes atividades existem no sentido de aumentar a eficiência do veneno em imobilizar a presa. Durante a evolução da espécie, mesmo com a perda de uma dessas atividades, as outras manteriam a eficiência biológica do veneno.

#### **1.3 Veneno botrópico**

Do veneno das espécies botrópicas (*Bothrops sp.*), são descritas três atividades fisiopatológicas: coagulante, proteolítica (definida como inflamatória aguda) e hemorrágica (Gutierrez e Lomonte, 2003). Evidentemente essas atividades são extremamente complexas e podem, usualmente, ser atribuídas a componentes específicos. No entanto, diferentes toxinas podem atuar de forma complementar para induzir um determinado efeito, assim como uma única toxina pode ter várias atividades (Ponce-Soto *et al.*, 2006).

Uma característica do envenenamento botrópico é a intensa dor local. O efeito hiperalgésico tem sido estudado experimentalmente em ratos com veneno de *Bothrops jararaca* (Teixeira *et al.*, 2003), demonstrando-se que este efeito é mediado, principalmente, por prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (PAF).

Em seguida, descrevemos as atividades mais importantes do envenenamento botrópico:

#### 1.3.1 Atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica do veneno é causada por toxinas denominadas hemorraginas, que são enzimas proteolíticas do tipo metaloproteinase (Fig. 1), já que sua atividade enzimática depende da presença de um átomo de zinco no seu sítio ativo (Bjarnason e Fox, 1994). As hemorraginas podem romper a integridade do endotélio vascular e tem atividade desintegrina, além de serem potentes inibidoras da agregação plaquetária. Já foram descritos e estudados os efeitos hemorrágicos de várias metaloproteases de espécies botrópicas, como é caso da BaP1, toxina hemorrágica 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), entre outras.

#### 1.3.2 Atividade coagulante e agregação plaquetária

O veneno botrópico possui capacidade de ativar fatores da coagulação sangüínea, ocasionando consumo de fibrinogênio e formação de fibrina intravascular, induzindo freqüentemente incoagulabilidade sangüínea, 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, 1997, 2005a). A batroxobina é uma enzima trombina like 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 *et al.*, 1998).

#### 1.3.3 Atividade Inflamatória

É causada por diversas frações do veneno botrópico, por exemplo, aminas biogênicas, préformadas do tipo histamina, enzimas como PLA<sub>2</sub>, esterases, proteases, enzimas liberadoras de cininas e lectinas. A atividade edematógena é muito potente, evidenciada nos casos clínicos e nos modelos experimentais. Nesses últimos, as doses de veneno ou frações requeridas para induzir um efeito significativo variam de uns poucos microgramas a décimos de microgramas (Teixeira, *et al.*, 2003). Nos estudos experimentais com a BaTX, uma PLA<sub>2</sub> homóloga K49 isolada de *Bothrops alternatus*, verificou-se que uma dose de 2,5 µg é capaz de produzir edema no modelo de coxim plantar de camundongo (Ponce-Soto *et al.*, 2007b); por outro lado, 0,9 µg de veneno de *Bothrops*  *asper* no mesmo modelo é capaz de induzir edema imediato e transitório na extremidade injetada (Lomonte *et al.*, 1993).

#### 1.3.4 Mionecrose

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 conseqüência do sangramento, compressão tissular e outras alterações inflamatórias, que também contribuem para a mionecrose. Todas as miotoxinas isoladas até o momento são proteínas básicas, com pesos moleculares ao redor de ~14kDa, cujas propriedades estruturais permitem classificá-las como fosfolipases A2. Algumas delas apresentam atividade enzimática, (PLA2 D49) enquanto outras, apesar de apresentarem estrutura molecular de fosfolipase, carecem dessa atividade (PLA<sub>2</sub> K49). Ambos os tipos de fosfolipases A<sub>2</sub> básicas induzem mionecrose quando injetadas em animais de laboratório (Ponce-Soto et al., 2002, 2006, 2007a; 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 melhor 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. Leucurus, conhecendo-se 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., 2007b; Higuchi et al., 2007; Randazzo Moura 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 participa e interage uma série de toxinas e onde se desencadeiam mecanismos endógenos. A Figura 1 resume o exposto anteriormente. Sem dúvida, permanece um grande número de incógnitas em relação à patogênese destes efeitos, o que constitui um desafio para a investigação toxinológica.



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

Além das atividades descritas anteriormente, estudos têm demonstrado que a peçonha de veneno Botrópico pode apresentar efeitos específicos sobre preparações neuromusculares isoladas, induzindo bloqueio da resposta muscular, ou ainda produzir sinais de neurotoxicidade em preparações neuromusculares *biventer cervicis* de pintainhos *in vitro*.

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 de sua ação neurotóxica. Isso se revelou através de estudos miográficos e de eletrofisiologia, sendo atribuído o efeito neurotóxico à fração denominada Bothropstoxina (BthTX) Esta fração foi purificada em duas etapas cromatográficas, sendo finalmente caracterizada e seqüenciada por Cintra *et al* (1993) como uma fosfolipase A<sub>2</sub> K49.

Prianti *et al* (2003) examinaram a ação do veneno de *B. leucurus* na preparação *biventer cervicis* de pintainho, reportando uma inibição dose-dependente da resposta contrátil de preparações estimuladas indiretamente, além de incrementar a liberação de CK.

Na literatura encontramos descrição de PLA<sub>2</sub> miotóxicas, neurotóxicas e não neurotóxicas. Heluany *et al* (1992) evidenciaram o efeito neurotóxico da BthTX sobre as preparações *biventer*  *cervicis* de pintainho e nervo frênico-diafragma isolado de camundongo. Cogo *et al* (1993) mostraram que o veneno de *B. insularis* também possui um efeito neurotóxico na preparação *biventer cervicis* de pintainho (evidenciando ser dose dependente) e também quantificaram níveis elevados de CK, revelando também o efeito miotóxico desse veneno. Posteriormente, foi demonstrado que a responsável pelo efeito neurotóxico era uma fosfolipase A<sub>2</sub> com atividade enzimática (Cogo *et al.*, 1998).

Costa *et al* (1999) evidenciaram que o veneno de *B. pirajai* possui um efeito miotóxico e neurotóxico, capaz de bloquear a resposta contrátil na preparação extensor *digitorum longus* (EDL) de rato. Soares *et al* (2000a) caracterizaram a BnSP-7, uma PLA<sub>2</sub> K49 de *B. neuwiedi pauloensis* como uma neurotoxina miotóxica. BaTX, uma PLA<sub>2</sub> K49 isolada de *B. alternatus*, também evidenciou bloqueio da resposta contrátil na preparação *biventer cervicis* de pintainho (Ponce-Soto *et al.*, 2007b).

Bonfim *et al* (2001), a partir do veneno total de *B. jararacussu*, isolaram uma fosfolipase  $A_2$  com atividade catalítica, denominada BjIV, a qual mostrou atividade miotóxica, mas foi desprovida de atividade neurotóxica em doses de 50 µg/ml na preparação de nervo frênico-diafragma isolado de camundongo.

Classicamente, são os venenos das serpentes corais e o gênero Crotalus as que possuem neurotoxinas, porém, está se demonstrando que o veneno botrópico possui frações capazes de induzir neurotoxicidade em preparações neuromusculares *in vitro* (Ponce-Soto *et al.*, 2007b).

#### **1.4** Bothrops brazili.

*B. brazili* é uma serpente peçonhenta comumente conhecida como "Jergón Shushupe" (Campbell e Lamar, 1989), pertencente à família Viperidae, subfamília Crotalinae. É amplamente encontrada na América do Sul, reportando-se sua presença no Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname e Guiana Francesa (Campbell e Lamar, 1989).

Esta serpente apresenta fosseta loreal, importante órgão termoreceptor, ademais tem contextura robusta, com tamanho médio em torno de 1,20m de comprimento (Figura 2) e encontrase freqüentemente na floresta primária. Seus alimentos principais são roedores e lagartixas. Conhece-se que a característica mais importante da *B. brazili* é que produz abundante quantidade de veneno em suas glândulas em comparação com outros viperidios. Por isso, no caso de envenenamento causado por *B. brazili*, ocorrem conseqüências sérias, devido aos componentes tóxicos presentes no veneno, assim como ao grande volume inoculado (Escobar *et al.*, 1996). Embora a *B. brazili* seja uma espécie agressiva e perigosa, o seu veneno tem sido pouco estudado, à diferença de outras espécies, tais como *B. jararaca, B. jararacussu, B. newidi, B. moojeni*, amplamente estudadas pela importância clínica que têm nos acidentes ofídicos.



Figura 2 Serpente Bothrops brazili. (Yarlequé, 2000).

Os efeitos locais observados no envenenamento de *B. brazili*, segundo os casos clínicos, são: dor intensa na zona afetada, formação de edema, diminuição da pressão arterial, coagulação intravascular disseminada, hemólise e, finalmente, necrose.

O veneno de *B. brazili* começou a ser estudado há poucos anos, com alguns trabalhos utilizando-se o veneno desta serpente (Muniz *et al*, 2000; Rojas *et al*, 2005). Incluem-se também informes de algumas purificações prévias e caracterizações parciais de componentes isolados, como é o caso de uma enzima proteolítica e o estudo de sua atividade sobre fibrinogênio (Azañero *et al*, 2000), purificaçõo e caracterizaçõo de uma L-amino oxidase (Solis *et al*, 1999), características bioquímicas e ação biológica de uma hemorragina (Isla *et al*, 2003), isolamento e propriedades de uma Fosfolipase A (Lazo *et al*, 1998; Zeballos *et al*, 1999).

Pantigoso *et al*, (2001, 2002) foram os primeiros a reportar a presença e a caracterização parcial de uma Miotoxina no veneno de *B. brazili*, determinando que a miotoxina tem massa molecular de 30 kDa e está formada por duas cadeias polipeptídicas de 15kDa cada uma. A inoculação desta miotoxina no músculo gastrocnêmico de camundongo produz una severa necrose do tecido, revelada pela liberação de creatina quinase e lactato desidrogenase, hipercontração, lesões delta e o incremento dos níveis de cálcio intramuscular. A miotoxina não possui atividade hemolítica nem anticoagulante, porém, produz edema.

Estudos preliminares das atividades farmacológicas feitas com veneno total de *B. brazili* (dados ainda não publicados) mostram que o veneno é capaz de induzir dano tissular local, hemorragia, mionecrose e atividade coagulante sobre o fibrinogênio. Também é evidenciada atividade PLA<sub>2</sub> e proteolítica. A Tabela 2 resume o perfil toxicológico do veneno total de *B. brazili* correlacionado com suas concentrações, cujos valores são significativos da presença dessas atividades farmacológicas.

Atividade	Veneno total de <i>B. brazili</i>
a. Atividade PLA <sub>2</sub>	$2,47 \pm 0,25$ nmoles/min
b. Atividade Hemorrágica	17±0,1 μg
c. Atividade Miotóxica	6,7±0,4 μg
d. Atividade Proteolítica	0,53±0,01 nmoles/min
e. Atividade Coagulante	2,2±0,2 μg

Tabela 2 Atividades toxicológicas de veneno total de Bothrops brazili.

Recentemente, Costa *et al* (2008) reportaram a purificação e a caracterização bioquímica de duas fosfolipases A<sub>2</sub> miotóxicas (MTX-I e MTX-II) isoladas de veneno de *Bothrops brazili*. Ambas PLA<sub>2</sub> foram purificadas em uma coluna de troca iônica CM-Sepharose, mostrando massas relativas em torno de 14 kDa. A seqüência de aminoácidos mostrou que a MTX-I pertence às PLA<sub>2</sub> D49, cataliticamente ativas e a MTX-II às PLA<sub>2</sub> K49, cataliticamente inativas. As duas toxinas induziram miotoxicidade e edema dose dependente.

#### **1.5** Fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)

As fosfolipases  $A_2$  (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 (Figura 3) (Arni e Ward, 1996).



Figura 3 Local de hidrólise de diferentes fosfolipases (Kini, 1997).

As PLA<sub>2</sub> são enzimas amplamente espalhadas na natureza, podendo ser encontradas em bactérias, plantas, tecidos de mamíferos (pulmão, fígado, baço, coração), eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleares (Van den Bosh, 1980). No entanto, as mais conhecidas e amplamente estudadas são aquelas encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos e nos venenos de répteis e insetos (Verheij *et al*, 1981).

As PLA<sub>2</sub> têm papel fundamental no metabolismo de lipídeos e estão intimamente relacionadas à liberação de ácido araquidônico, que é um precursor de lipídeos bioativos, tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, sendo que há evidências de que estas enzimas poderiam também atuar em respostas imunológicas, inflamação, proliferação celular, vasoconstrição (Bomalaski e Clark, 1993; Mukherjee *et al*, 1994; Hanada *et al*, 1995).

Durante muitos anos, as  $PLA_2$  conhecidas foram aquelas secretadas pelo pâncreas de mamíferos e provenientes do veneno de serpentes. Estas  $PLA_2$  são solúveis, extracelulares e possuem alto conteúdo de pontes dissulfeto, com uma massa molecular baixa de 14 kDa e requerem níveis de Ca<sup>2+</sup> na ordem de mM para que ocorra a catálise.

De acordo com a literatura, as PLA<sub>2</sub> são muito mais que simplesmente enzimas hidrolíticas; as pesquisas recentes buscam os novos papéis das PLA<sub>2</sub> intracelulares, no entanto, várias enzimas secretadas têm sido registradas na maioria das células. Também têm sido encontrados vários novos papéis das PLA<sub>2</sub> que diferem consideravelmente das PLA<sub>2</sub> secretadas.

As fosfolipases A<sub>2</sub> foram divididas em dois grandes grupos quanto à dependência de cofatores, principalmente do cálcio, são elas: PLA<sub>2</sub> cálcio dependente e PLA<sub>2</sub> cálcio independente. Denis, (1994) classificou as PLA<sub>2</sub> em quatro grandes classes: I, II, III e IV, sendo que as PLA<sub>2</sub> das

classes I, II, e III foram classificadas como enzimas extracelulares, caracterizadas por um número alto de pontes dissulfeto, em torno de 5 a 7, e por possuírem baixa massa molecular, em torno de 12 a 15 kDa. As PLA<sub>2</sub> da classe IV são constituídas pelas PLA<sub>2</sub> de alta massa molecular, de origem intracelular, que têm como substrato específico o ácido araquidônico.

Six e Dennis, (2000) atualizaram a classificação das várias PLA<sub>2</sub> descritas até agora na literatura. Nesta revisão foram empregados quatro critérios para classificar estas proteínas em um dos 11 Grupos (I-XI) de PLA<sub>2</sub>. Primeiro: a enzima tem que catalisar a hidrólise da ligação éster sn-2 de um substrato fosfolipídio natural, como fosfolipídios com cadeias de ácido graxo longa ou fator ativador de plaquetas. Segundo: deve ser conhecida a seqüência completa de aminoácidos da proteína madura. Terceiro: cada grupo de PLA2 deveria incluir as enzimas que têm homologia de seqüência facilmente identificável. Se existir mais de um gene homólogo de PLA2 dentro de uma espécie, então deveria ser nomeado como um subgrupo, como é o caso dos grupos IVA, IVB, e IVC. Enzimas homólogas de espécies diferentes deveriam ser classificadas dentro do mesmo subgrupo, onde quer que tais assinaturas sejam possíveis, como é o caso das PLA2 do peixe Paulistinha e as PLA2 humanas, classificadas no grupo IVA. O esquema de classificação atual permite exceções históricas de grupos altamente homólogos I, II, V, e X. Quarto: variantes cataliticamente ativas do mesmo gene são classificadas como mesmo grupo e subgrupo, porém são distintas usando números árabes, como os grupos VIA-1 e VIA-2. Esses quatro critérios conduziram à expansão ou à reordenação de grupos VI, VII e VIII, assim como a adição do grupo XI. Assim, de fato, as PLA<sub>2</sub> são uma família de enzimas muito mais diversa do que se tinha considerado previamente.

Sabe-se que o veneno de serpentes é uma fonte rica de PLA<sub>2</sub> e estas enzimas possuem atividades tóxicas e/ou farmacológicas como: mionecrose, anticoagulante inibição da agregação plaquetária, cardiotoxicidade, hipotensão e atividade edematogênica (Gutiérrez e Lomonte, 1997). A presença de várias isoformas de PLA<sub>2</sub> no veneno de uma única espécie de serpente tem sido demonstrado por ser um fato comum. Por exemplo, no veneno de *Bothrops jararacussu*, chegaram a ser identificadas mais de cinco isoformas de PLA<sub>2</sub> (Cintra *et al*, 1993; Bonfim *et al*, 2006a; Ponce-Soto *et al*, 2006). A separação das isoformas de PLA<sub>2</sub> só tem sido possível a partir da utilização de sistemas de HPLC de fase reversa (Toyama *et al.*, 2000; Bonfim *et al.*, 2006a, b; Ponce-Soto *et al.*, 2002, 2006, 2007a, b, c).

As PLA<sub>2</sub> da família Viperidae, segundo Six e Dennis, (2000), são colocadas na classe II e estão subdivididas em dois grupos principais: (1) As PLA<sub>2</sub> D49, as quais possuem um resíduo de Aspartato na posição 49, têm alta atividade catalítica e (2) as PLA<sub>2</sub> K49, com um resíduo de Lisina

na posição 49, são proteínas com pouca ou nenhuma atividade catalítica (Gutierrez e Lomonte, 1995; Selistre de Araújo *et al*, 1996; Arni e Ward, 1996; Ownby *et al*, 1999; Six e Dennis, 2000).

Ambas as enzimas mostram similaridade significante em sua estrutura tridimensional, embora exibam propriedades farmacológicas diferentes, o que as torna alvos interessantes para muitas pesquisas (Arni e Ward, 1996; Gutiérrez e Lomonte, 1995; Kini, 2005b).

#### 1.5.1 Ação biológica das PLA<sub>2</sub>

As PLA<sub>2</sub> de serpentes incluem vários efeitos farmacológicos, tais como: neurotoxicidade pré e pós sináptica, miotoxicidade, atividade anticoagulante, convulsionante, hipotensiva, hemolítica, hemorrágica e edematogênica (Kini e Iwanaga, 1986: Kini e Evans, 1987). Esta diversidade de efeitos farmacológicos deriva de um processo micro-evolutivo acelerado, através do qual ocorre substituição de aminoácidos nas regiões moleculares localizadas principalmente na superfície destas moléculas (Kini e Chan, 1999).

No caso das PLA<sub>2</sub> D49 cataliticamente ativas, os efeitos farmacológicos são produtos da atividade enzimática. No modelo de ação destas PLA<sub>2</sub>, a unidade catalítica compreende os resíduos de aminoácidos His 48, Asp 99 e uma molécula de água (Figura 4). No mecanismo de catálise proposto, o próton na posição 3 do anel imidazólico da His 48 está envolvido em uma forte interação com o grupo carboxilato do Asp 99, impedindo que ocorra rotação do anel imidazólico, deixando o nitrogênio da posição 1 deste anel (que está envolvido na catálise) em posição espacial apropriada.

Uma molécula de água promove, então, o ataque nucleofilico ao carbono do grupo éster do substrato, e nesse momento o anel imidazólico da His 48 recebe um próton da molécula de água, facilitando a reação. Subseqüentemente à hidrólise da ligação acil-éster na posição sn-2 do fosfoglicerídeo (substrato), este próton é doado pelo anel imidazólico para o oxigênio, que forma então o grupo álcool do lisofosfolipídeo a ser liberado. (Verheij *et al*, 1980).

O íon cálcio cataliticamente importante 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 (Yang, 1994).

As PLA<sub>2</sub> que não dependem de cálcio são, de forma geral, ativadas e estabilizadas na presença de ATP. Basicamente o ATP modularia a polimerização dessas PLA<sub>2</sub>, o que as tornaria cataliticamente ativas e estáveis (Dennis,1994).



Figura 4 Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para as PLA<sub>2</sub> (Verheij et al., 1980).

Já as PLA<sub>2</sub> K49 que são desprovidas de atividade enzimática, para desencadear suas atividades biológicas, dependem de outros mecanismos, que são independentes da liberação do ácido araquidônico (Selistre de Araújo *et al*, 1996; Arni e Ward, 1996; Ownby *et al*, 1999).

Segundo Gutiérrez e Lomonte (1995), estas PLA<sub>2</sub> poderiam se ligar a determinados sítios com uma carga parcial negativa que poderia servir de ancoragem para as PLA<sub>2</sub>. Unidas assim à membrana celular, poderiam gerar uma desorganização da membrana, levando à alteração na permeabilidade e conseqüente destruição celular, devido, preferencialmente, à desorganização celular, mais do que pela toxicidade da PLA<sub>2</sub>.

Segundo Kini (2003), as  $PLA_2$  procedentes de veneno de serpentes possuem uma habilidade de se unir a um "sítio específico", devido a sua alta afinidade de se ligar a proteínas específicas que atuam como receptores. Essa ligação específica de  $PLA_2$  se dispõe pela presença de um "sítio farmacológico" em sua superfície, que é independente do sítio catalítico.

A interação da alta afinidade da PLA<sub>2</sub> com seu receptor (proteína alvo) deve-se provavelmente à complementaridade de carga, hidrofobicidade e forças de Van der Waalls, que se dão entre o sítio farmacológico da enzima e o sítio alvo na superfície do receptor protéico. A identificação dos sítios farmacológicos tem o potencial para a exploração no desenvolvimento de novos sistemas úteis (inibidores específicos), devido ao amplo espectro de especificidade em tecidos e órgãos, para o "direcionamento" de proteínas específicas a um tecido alvo particular ou órgão.

Assim, a Figura 5 representa a hipótese apresentada por Kini (2003):

1 – A célula alvo difere de uma célula não alvo (extremo direito), pela presença de um sítio
 (A) na superfície da célula. Estes sítios alvos podem ser uma proteína ou uma glicoproteína transmembrana.

2 – Temos o sítio complementar ao sítio alvo, o sítio farmacológico (F) está presente na PLA<sub>2</sub> específica, além do sítio catalítico (C). Uma PLA<sub>2</sub> não específica (extremo direito) não possui o sítio farmacológico (F). A natureza e a posição dos sítios farmacológicos na superfície molecular das PLA<sub>2</sub> variam com a enzima.

3 – Quando se administra a PLA<sub>2</sub>, através da via intraperitoneal ou intravenoso, as PLA<sub>2</sub> específicas procuram e se ligam às células alvos, devido a sua afinidade alta pelo sítio alvo. Esta ligação específica, assim como a acessibilidade do sítio alvo, dependerá da acessibilidade da célula. De outro lado, uma PLA<sub>2</sub> não específica vai se ligar a muitos tipos diferentes de células. As PLA<sub>2</sub> não específicas, assim, não vão lesar a célula alvo eficazmente como a PLA<sub>2</sub> específica.

4 – Um sistema *in vitro*, uma célula, tecido ou órgão incuba-se com a PLA<sub>2</sub>. As PLA<sub>2</sub> específicas e não específicas podem lesar a célula alvo e poderiam exibir "efeitos farmacológicos". Isto é particularmente verdade quando a atividade enzimática desempenha um papel maior, induzindo o efeito farmacológico, embora sejam necessárias quantidades mais altas (ou cataliticamente as quantidades muito eficazes) de enzimas não específicas para induzirem os efeitos similares das PLA<sub>2</sub> específica.

 $5 - As PLA_2$  específicas se ligam ao sítio alvo na membrana plasmática (MP) com uma alta afinidade (10<sup>-9</sup> mol/L). No entanto, também ocorre uma afinidade baixa (10<sup>-4</sup> a 10<sup>-6</sup> mol/L) quando se liga a fosfolipídios. Os estudos de ligação específica sempre indicam a afinidade alta e baixa aos sítios alvos. A afinidade é alta ao sítio alvo, é baixa comparada a sítios de ligação de baixa afinidade. Os tratamentos para destruir as proteínas alvo produzem a perda da alta afinidade de se ligar, mas não diminuem a afinidade dos sítios alvos. Assim, as PLA<sub>2</sub> não específicas ligam-se aos fosfolipídios com afinidade baixa e não se ligam ao sítio alvo.

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



Figura 5 - Modelo para explicar os efeitos farmacológicos das PLA<sub>2</sub> (Kini 2003).

Diaz-Oreiro e Gutiérrez (1997) demonstraram que modificações químicas realizadas nos resíduos de lisina inibem substancialmente a atividade miotóxica e anticoagulante, mostrando a importância dos resíduos de lisina. De acordo com os trabalhos de Arni e Ward (1996) e Selistre de Araujo *et al*, (1996), estas lisinas e outros aminoácidos carregados positivamente ajudariam as miotoxinas PLA<sub>2</sub> a se posicionarem sobre um ou mais sítios receptores localizados na membrana celular das fibras musculares. De acordo com Gutiérrez e Lomonte (1995) e Selistre de Araújo *et al*, (1996), existem evidências da presença de receptores de alta afinidade. Estes receptores poderiam ser, de acordo com os trabalhos de Fletcher *et al*, (1997), receptores ligados aos canais de sódio ou o próprio canal poderia estar envolvido.

Todas essas atividades farmacológicas associadas a um tipo de macromolécula, como as PLA<sub>2</sub>, não dependem do mecanismo clássico de quebra do fosfolipídio. Portanto, estes mecanismos são independentes da atividade catalítica (Gutiérrez e Lomonte, 1995).

#### **1.5.2** PLA<sub>2</sub> miotóxicas.

As miotoxinas PLA<sub>2</sub>, componentes importantes dos venenos, são de dois tipos: neurotóxica e não neurotóxica. As não neurotóxicas podem ser PLA<sub>2</sub> D49 ou PLA<sub>2</sub> homólogas K49 (Mebs e Ownby, 1990).

As miotoxinas  $PLA_2$  neurotóxicas são encontradas comumente na peçonha de Elapidios, onde possuem o papel principal da letalidade. Os valores de  $DL_{50}$  são extremamente baixos, devido ao potente efeito pré-sináptico na junção neuromuscular (Rosenberg, 1990), mas também podem se encontrar em Viperidios, como é o caso da crotoxina de *C. d. terrificus*.

As miotoxinas  $PLA_2$  não neurotóxicas são os componentes mais abundantes nos Viperidios, possuem valores altos de  $DL_{50}$  (Gutierrez *et al*, 1986; Rosemberg, 1990; Angulo *et al*, 1997; Soares *et al*, 2000 a, b), sua potência miotóxica é mais fraca quando comparada com as  $PLA_2$  neurotóxicas. Mas devido a sua quantidade abundante no veneno, estas toxinas são as principais no desenvolvimento da mionecrose.

O modo de ação das  $PLA_2$  miotóxicas K49 e as D49 no músculo ocorrem por vias diferentes, mas, em geral, podem causar lise rápida do sarcolema (membrana plasmática) e um rápido estado de mionecrose (Fletcher *et al*, 1996).

Várias miotoxinas isoladas nestes últimos anos tem sido caracterizadas como proteínas básicas de massa molecular em torno de 13 kDa. As 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>2</sub> miotóxicas e, eventualmente, em tetrâmeros. Estas associações são principalmente dependentes de resíduos de tirosina (Y) (Arni e Ward, 1996; Bonfim *et al*, 2006b).

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>2</sub> se encontram associadas, por exemplo, em dímeros, o que é comum com as PLA<sub>2</sub> K49.

As miotoxinas PLA<sub>2</sub> que foram melhor 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. Leucurus, Crotalus durissus terrificus, Crotalus durissus collilineatus, Crotalus durissus ruruima, etc. conhecendo-se a seqüência de aminoácidos de algumas delas, assim como a sua estrutura cristalina (Kaiser et al, 1990; Cintra et al, 1993; Soares et al, 2000a,b; Ponce-Soto et al, 2007a,b,c; Higuchi et al, 2007; Randazzo Moura et al, 2008).

A patologia da necrose muscular induzida por estas miotoxinas, investigada com o uso de técnicas histológicas, ultra-estruturais e de microscopia vital, revela pequenas alterações na membrana plasmática – denominadas lesões delta –, hipercontração dos miofilamentos, alterações mitocondriais – como aumento de seu volume – ruptura das membranas e formação de densidades floculentas que resultam da aglomeração de proteínas da membrana interna da mitocôndria. Os núcleos têm aspecto picnótico e as membranas intracelulares se alteram, com formação de múltiplas vesículas no interior do espaço celular (Harris e Culen, 1990; Mebs e Ownby, 1990; Gutierrez e Lomonte, 2003). As diferentes miotoxinas PLA<sub>2</sub> induzem um padrão similar de alterações morfológicas, independentemente de apresentarem atividade enzimática (Gutiérrez *et al*, 1991; Gutiérrez e Ownby, 2003).

O mecanismo de ação dessas miotoxinas não se encontra elucidado plenamente do ponto de vista molecular. Estudos com lipossomas indicam que as toxinas são capazes de lesar diretamente a membrana plasmática (Diaz *et al*, 1991). Resultados apóiam que as miotoxinas de *Bothrops* se unem e lesam a membrana plasmática da célula muscular como passo fundamental para a necrose. Uma vez que existem as PLA<sub>2</sub> K49, essa alteração da membrana não depende necessariamente da hidrólise de fosfolipídeos e, possivelmente, seja conseqüência da ação de um domínio molecular, capaz de penetrar e desorganizar a bicamada lipídica. Como exemplo, podemos citar a Miotoxina II isolada de veneno de *Bothrops asper*; sugere-se que a região responsável seria uma porção no extremo C-terminal, rica em aminoácidos básicos e hidrofóbicos (Lomonte *et al*, 1994). Por outro

lado, para as miotoxinas que apresentam atividade fosfolipase A<sub>2</sub>, sugere-se que esta atividade contribua para aumentar a alteração da membrana, já que a inibição da atividade enzimática reduz a extensão da necrose muscular (Diaz-Oreiro e Gutiérrez, 1997). A atividade catalítica também é dependente da presença de certas regiões moleculares conservadas, como a região "short" N-terminal, que é parte do canal hidrofóbico onde os lipídeos entrariam para serem digeridos; modificações de alguns resíduos desta região parecem estar associadas também com perda das atividades biológicas, como a agregação plaquetária (Arni e Ward, 1996).

Uma vez produzida a lesão da membrana plasmática, ocorre uma entrada maciça de cálcio, o que gera uma enorme quantidade de alterações celulares. A Figura 6 mostra um resumo da hipótese para o mecanismo de ação celular das miotoxinas PLA<sub>2</sub>.



**Figura 6** Hipótese sobre o mecanismo de ação das fosfolipases  $A_2$  miotóxicas do veneno de *Bothrops* sp. (Gutierrez e Lomonte, 2003).

#### 1.5.3 Neurotoxinas.

Um dos maiores alvos dos venenos de serpentes é o sistema nervoso somático, em particular a junção neuromuscular. A inibição dos neurotransmissores neste sítio resulta na paralisia dos músculos extraoculares, assim como na paralisia dos músculos respiratórios, resultando em morte (Campbell, 1966; Lalloo, 1996).

As neurotoxinas de veneno de serpentes que alteram a transmissão no terminal motor têm sido de considerável importância clínica e de pesquisas durante as últimas três décadas. Sua estrutura e modo de ação têm sido estudados de forma muito extensa.

Devido aos maiores avanços nas técnicas da química de proteínas, as neurotoxinas são continuamente isoladas do veneno de diversas espécies de serpentes (Tu, 1996).

Estudo dos detalhes da estrutura química têm revelado uma inesperada inter-relação entre estrutura e função. O bloqueio do processo fisiológico é uma situação vital a ser abordada, assim como o conhecimento do sítio responsável e o mecanismo de ação em nível molecular. A ação neurotóxica não só se confina no terminal motor; as pesquisas recentes têm mostrado esta ação em diferentes preparações nervosas (Tu, 1996).

#### 1.5.3.1 Neurotoxinas pré-sinápticas

Denominadas como  $\beta$  neurotoxinas, inibem o processo de liberação da acetilcolina. A liberação destas toxinas é em geral maior do que as toxinas pós-sinápticas; como exemplo, pode-se citar a  $\beta$ -bungarotoxina, que é uma toxina composta por duas subunidades: uma PLA<sub>2</sub> e outra subunidade com estrutura similar ao inibidor de tripsina (12,4 e 8,8 kDa respectivamente), as duas interligadas por pontes dissulfeto (Chang *et al*, 1973). As atividades neurotóxicas não aparentam estar diretamente correlacionadas a sua atividade fosfolipásica e à subseqüente hidrólise de fosfolipídios de membrana. (Rosenberg, 1990).

A neurotoxina pré-sináptica pode ser um polipeptídio de cadeia simples (e.g notexina) ou toxinas que consistem de múltiplas subunidades. Por exemplo, crotoxina, taipoxina e textiloxina consistem de duas, três e cinco subunidades, respectivamente.

Dois tipos de neurotoxinas pré-sinápticas provenientes de veneno de serpentes são conhecidas: as  $\beta$ -neurotoxinas, que são caracterizadas pela presença da atividade catalítica PLA<sub>2</sub> e têm sido estabelecidas nos venenos de serpentes das famílias *Elapidae, Crotalidae* e *Viperidae;* e as neurotoxinas pré-sinápticas facilitatórias, incluindo a *dendrotoxina* com bloqueio do canal de potássio voltagem-dependente, e a toxina *antiacetilcolinesterase*. As toxinas do segundo grupo são próprias do veneno de *Dendroaspis*, são polipeptídios com seqüências homólogas aos inibidores de proteinases tipo Kunitz e com as curare-like pós-sinápticas que são  $\alpha$ -neurotoxinas e cardiotoxinas respectivamente (Harvey, *et al,* 1994).

A maioria dos venenos contém múltiplas isoformas de uma neurotoxina, que diferem em suas seqüências de aminoácidos (Harris, 1991). Por enquanto não parece existir uma correlação direta entre cadeia estrutural e potência, mas tem sido postulado que há uma relação entre cadeia estrutural e ligação. Algumas das neurotoxinas pré-sinápticas têm sido bem caracterizadas, enquanto outras (como a paradoxina) requerem mais investigações. Em geral, estas toxinas produzem bloqueio neuromuscular por inibição da liberação de acetilcolina do terminal motor. A

ação neurotóxica caracterizada pelo bloqueio neuromuscular (como conseqüência da inibição da liberação da acetilcolina, no terminal nervoso) não altera significantemente a sensibilidade da placa motora para a acetilcolina, ou seja, quando age uma neurotoxina pré-sináptica, não necessariamente há destruição do músculo da fibra muscular.

#### 1.5.3.2 Neurotoxinas pós-sinápticas.

São toxinas que se ligam aos receptores colinérgicos nicotínicas da região sub-sináptica da placa motora. Denominadas como  $\alpha$ -neurotoxinas, são capazes de bloquear de forma reversível a transmissão nervosa, ligando-se competitivamente aos receptores colinérgicos nicotínicos da região pós sináptica de músculos esqueléticos e neurônios, evitando a transmissão neuromuscular e conduzindo à morte por asfixia (Tselin e Hucho, 2004)

As neurotoxinas pós-sinápticas são peptídeos de baixa massa molecular (7 a 8 kDa), possuem entre 60 e 70 aminoácidos, e são desprovidas de atividade enzimática (Karlsson *et al*, 1979).

#### **1.6** Ferramentas moleculares.

Embora as picadas das serpentes possam ser mortais, o veneno de serpentes é um recurso biológico natural que contém componentes de valor terapêutico potencial. O veneno foi usado no tratamento de uma variedade de doenças, homeopatia e medicina popular. Com o advento da biotecnologia, a eficácia de tais tratamentos foi demonstrada purificando os componentes de veneno e delineando as propriedades terapêuticas deles. Como é o caso das neurotoxinas isoladas de venenos de serpentes, as quais mostram significantes efeitos analgésicos em modelos animais e têm a vantagem que são altamente seletivas e efetivas, com menos efeitos secundários (Chen *et al*, 2006).

Peptídeos com atividade tóxica proveniente do veneno de origem animal, de microorganismos ou vegetais têm sido largamente utilizados no estudo dos mecanismos de ação e dos processos metabólicos, pois estes peptídeos interagem especificamente com receptores, inibindo ou estimulando várias funções celulares, constituindo-se, portanto, como ferramentas moleculares valiosas dentro da fisiologia e da farmacologia. Como exemplo, pode-se citar a importância da "dendrotoxina", uma neurotoxina isolada da serpente *Dendroaspis angusticeps,* proteína pequena que bloqueia seletivamente os canais de potássio dependentes de voltagem em neurônios e que permitiu conhecer as propriedades de reconhecimento molecular dos diferentes tipos de canais iônicos de potássio (Harvey e Robertson, 2004).

As toxinas, em geral, bem como as neurotoxinas, em particular, também têm sido utilizadas como sondas com diferentes finalidades, como a síntese de novas drogas, como agentes terapêuticos (tubocurarina e a toxina botulínica) ou na forma de medicamentos como o Captopril, que foi sintetizado a partir do modelo molecular da toxina de *Bothrops jararaca* (Harvey *et al.*, 1998).

Existem neurotoxinas – tais como a crotamina, miotoxina A, cardiotoxinas, melitina e as fosfolipases  $A_2$  – que são toxinas que exibem grande potencial para sua utilização como ferramentas moleculares no estudo de determinadas patologias, como a mionecrose. Estudos realizados por Rodrigues-Simioni *et al*, (1995) e Prado-Franceschi *et al*, (1998) mostraram que a Bothrosptoxina-I é uma miotoxina com estrutura de PLA<sub>2</sub>, mas sem atividade catalítica (Cintra *et al*, 1993). Esta toxina pode interagir com canais de sódio tetrodotoxina dependentes para provocar mionecrose, sendo que esta toxina também é capaz de promover a liberação de Ca<sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático, interagindo, então, diretamente com os canais ou com um outro receptor.

Até agora não há estudos a respeito de um fator, ou fatores neurotóxicos, que apresente a peçonha de *B. brazili*. A falta deste tipo de estudos é devido provavelmente à ausência de sintomas neurotóxicos característicos do envenenamento causado por serpentes corais e cascavéis. Nossos estudos iniciais têm revelado a presença de fatores neurotóxicos capazes de levar à diminuição da resposta contrátil na preparação muscular *biventer cervicis* de pintainho, criando uma grande expectativa pelo isolamento, purificação, caracterização bioquímica e biológica do fator responsável por este efeito, sem desconsiderar a possibilidade de se tratar de fosfolipases A<sub>2</sub> com atividade neurotóxica.

#### 2. **OBJETIVOS**

#### 2.1 Objetivos gerais.

2.1.1 Purificação e caracterização estrutural e funcional das miotoxinas PLA<sub>2</sub> D49 e K49 do veneno de *Bothrops brazili*.

#### 2.2 Objetivos específicos.

- 2.2.1 Purificar as isoformas de PLA<sub>2</sub> D49 e PLA<sub>2</sub> K49, procedentes de veneno de *Bothrops brazili*.
- 2.2.2 Caracterizar fisico-quimicamente as PLA<sub>2</sub> D49 e PLA<sub>2</sub> K49 isoladas de veneno de *B. brazili* através de eletroforese SDS-PAGE, espectrometria de massa (MALDI-TOf), composição de aminoácidos e determinação da estrutura primária.
- 2.2.3 Caracterizar enzimaticamente as PLA<sub>2</sub> D49 isoladas de veneno de *B. brazili* através dos efeitos de pH, temperatura, concentração de substrato e íons.
- 2.2.4 Avaliar a atividade neurotóxica *in vitro* na preparação *biventer cervicis* de pintainho (BCP), atividade miotoxicidade local e sistêmica através dos níveis plasmáticos de CK, atividade edematogênica e letalidade intracerebroventricular (i.c.v.).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS.

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

O veneno bruto de *B. brazili* foi coletado da Amazônia peruana e dissecado no laboratório de Química Biológica da Escola de Biologia da Universidade de San Agustín de Arequipa – Peru, e cedido pelo Professor Ronald Navarro Oviedo.

Todos os reagentes utilizados foram de grau HPLC, obtidos da Sigma, Aldrich, Chemicals, Merk e Bio Rad.

#### 3.2 Animais

Para os ensaios biológicos, foram utilizados camundongos machos Swiss (18 a 20g) 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 nº 1505-1).

#### 3.3 Purificação do veneno total de Bothrops brazili

#### 3.3.1 Cromatografia de Exclusão Molecular em coluna de Sephadex G-75

50 mg de veneno total foram homogeneizados em tampão bicarbonato de amônio 1M pH 8 (AMBIC). A solução obtida foi clarificada centrifugando-a a 9000rpm por três minutos. O sobrenadante foi aplicado na coluna de exclusão molecular (Kontex Flex Column 78 X 2cm) contendo a resina Sephadex G-75, previamente equilibrada com tampão AMBIC 0,2M. O material foi eluído com AMBIC 0,2M, com fluxo constante de 0,25ml/min e monitorado a 280nm. As frações foram coletadas em um coletor de frações automático da Pharmacia Biotech, liofilizadas e armazenadas a -20°C.

#### 3.3.2 HPLC de fase reversa

A fração com atividade PLA<sub>2</sub>, obtida no passo anterior, foi aplicada em um sistema HPLC de fase reversa, seguindo a metodologia descrita por Ponce-Soto *et al* (2006). O sistema cromatográfico usado é o HPLC - PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, um injetor automático de amostras U6K com um "loop" de 200µL e uma coluna Shim Pack CLC-ODS(M) C18 (4,6mm x 25cm), previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%, (v/v) (tampão A) pH 3,5. Brevemente, 5mg da fração foram dissolvidas em 200µl de TFA 0,1%, a solução obtida foi centrifugada para clarificação e o sobrenadante aplicado na coluna. As proteínas foram eluídas usando-se um gradiente linear contínuo (0-100%) de do tampão B (acetonitrila

66,5%, TFA 0,1%). O fluxo foi mantido constante a 1ml/min e monitorado a 280nm. As frações obtidas foram liofilizadas e armazenadas a -20°C.

#### 3.4 Caracterização físico-química das PLA<sub>2</sub> isoladas de veneno de B. brazili

#### 3.4.1 Eletroforese em PAGE-SDS

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, apresentando um gel de concentração de 5% e um gel de corrida de 12,5%. As placas foram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque. O gel de concentração a 5% foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 1M, pH 6,8 e o gel de corrida foi feito utilizando-se o tampão Tris-HCl 1M, pH 6,8 e o gel de corrida foi feito utilizando-se o tampão Tris-HCl 1M, 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 Mighty Small II SE 260 (Hoefer Scientific Instruments).

As amostras e os marcadores de massa molecular foram dissolvidos em tampão da amostra (Tris-HCl 0,075M, pH 6,8; 10% de glicerol; 4% de SDS; 0,001% de azul de bromofenol). A massa molecular dos marcadores em kDa são: Fosforilase b – 94, Albumina – 67, Ovoalbumina – 45, Anhidrase carbônica – 30, inibidor de tripsina – 20,1,  $\alpha$  Lactoalbumina 14,4. A corrida foi realizada com amperagem constante de 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%.

#### 3.4.2 Espectrometria de Massas por MALDI-TOf

A massa molecular das toxinas foi analisada por Espectrometria de Massas, utilizando-se um Voyager DE PRO MALDI TOF espectrômetro de massas (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 1 µl da amostra dissolvida em TFA 0,1% é misturada a 2 µl da matriz (ácido 3,5dimetoxi-4-hidroxicinamico). A matriz foi preparada com ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinamico (Sigma), 60% de acetonitrila e 0,1% (v/v) de TFA. A massa foi analisada de acordo com os seguintes parâmetros: aceleração de voltagem 25 kV, laser ajustado a 2890 mJ/com<sup>2</sup> em 300 ns e o modo de análise foi linear (Ponce-Soto *et al*, 2006).

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

A determinação da atividade PLA<sub>2</sub> foi realizada segundo o método descrito por Cho e Kézdy (1991) e Holzer e Mackessy (1996) e adaptado para microplaca (Ponce-Soto *et al*, 2006).
A mistura para o ensaio contém 200µl de tampão (Tris-HCl 10mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM e NaCl 100mM pH 8), 20µl do substrato cromogênico ácido 4-nitro-(3-octanoiloxi) benzóico (NOAB), 20 µl de água ou 20µl de PLA<sub>2</sub>, em volume final de 260µl. Após a adição de 20µl 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 (Vo) 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 hidroxi) benzóico (cromóforo), lendo-se a absorvância a 425nm em um VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Uma unidade enzimática (UE) é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1nmol de produto por minuto.

### 3.4.4 Estudos cinéticos da PLA<sub>2</sub> D49 isolada de veneno de B. brazili

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

Os ensaios do efeito do pH sobre a atividade  $PLA_2$  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  $PLA_2$  foi feita conforme ao item 3.4.3. 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.

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

Para determinação da temperatura ótima, estudamos a atividade  $PLA_2$  em meios de reação de 25, 30, 35 40 e 45°C. A atividade enzimática foi determinada conforme ao item 3.4.3.

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

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

## 3.4.4.4 Efeito de íons divalentes na atividade PLA<sub>2</sub>

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

#### 3.4.5 Análise de composição de aminoácidos

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

#### 3.4.6 Determinação da estrutura primária (seqüenciamento)

### 3.4.6.1 Redução e Carboximetilação

As toxinas purificadas, conforme descrito na parte de purificação, foram repurificadas em HPLC de fase reversa, usando-se uma coluna analítica. A toxina pura foi dissolvida em guanidina/HCl 6M, Tris 0,4M pH 8,15, EDTA 2mM, reduzida com ditiotreitol (DTT) e carboximetilada com [<sup>14</sup>C]-ácido iodo acético (Marangoni, *et al* 1995). A dessalinização da amostra foi realizada em coluna G-25, previamente equilibrada com ácido acético 1M.

## 3.4.6.2 Digestão enzimática e purificação dos fragmentos peptídicos

As toxinas liofilizadas, reduzidas e carboximetiladas foram inicialmente digeridas com duas enzimas: a protease V8 de *Staphilococcus aureus*, por 16h a 37°C com uma razão enzima/substrato de 1:30. A reação foi interrompida e a amostra foi liofilizada logo em seguida, de acordo com o método descrito por Houmard e Drapean (1972).

As toxinas também foram digeridas com Clostripaina por 8h, a 37°C, segundo processo descrito por Cintra *et al* (1993). Após interrupção da reação, a amostra foi liofilizada. As toxinas digeridas com Clostripaina e com protease V8 foram repurificadas em HPLC de fase reversa (Water PDA 991 System), usando-se uma coluna  $\mu$ -Bondapack C-18. A separação dos peptídeos foi feita com um gradiente de Acetonitrila em 0,1% de ácido Trifluoracético.

## 3.4.7 Estudo da seqüência N-terminal e homologia

A seqüência de aminoácidos foi obtida pelo seqüenciamento da região N-terminal da proteína reduzida e carboximetilada, e o seqüenciamento completo foi feito através dos peptídeos obtidos por hidrólise enzimática.

Tanto o seqüenciamento automático da região N-terminal, como dos peptídeos, foram feitos em um seqüenciador automático modelo Procise f 491 da Applied Biosystem. Os PTH aminoácidos

foram identificados em um analisador automático de PTH aminoácidos modelo 120 A (Applied Biosystem) de acordo com o tempo de retenção dos 20 PTH aminoácidos padrões.

Os estudos de homologia seqüencial foram realizados utilizando o banco de dados da SWISS-PROT: Annonated protein sequence database (http://www.expasy.ch/sprot/).

### 3.5 Caracterização biológica das PLA<sub>2</sub> K49 e PLA<sub>2</sub> D49 isoladas de veneno de B. brazili

### 3.5.1 Atividade Miotóxica

Para a determinação das atividades miotóxicas local e sistêmica produzidas a partir da exposição às toxinas em estudo, grupos de 4 camundongos (18 a 20g) receberam injeções intramusculares (músculo gastrocnêmio) e intravenosas (veia da cauda) respectivamente, de quantidades variadas das toxinas dissolvidas em 100 µl de tampão PBS, sendo que o grupo controle recebeu apenas PBS.

Após a aplicação das toxinas em intervalos de tempo (2, 4, 6, 9, 12 e 24 horas), amostras de sangue foram coletadas da cauda em capilares heparinizados e o plasma 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  $\mu$ l do substrato reconstituído foram pré-incubados por 4 minutos a 37°C, logo foram acrescentados 5  $\mu$ l 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. Determinou-se a diferença média de absorbância por minuto ( $\Delta$ A/min), 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.

### 3.5.2 Atividade Edematogênica

Para a determinação da atividade edematogênica ocasionada pelas toxinas em estudo, grupos de 4 camundongos (18-20 g) receberam injeções subcutâneas das toxinas na pata direita.

Inoculou-se 10 µg dissolvidos em 50 µl de tampão PBS de cada toxina no coxim plantar da pata direita do camundongo; a pata esquerda recebeu 50 µl de PBS como controle.

Foram feitas medições em diferentes intervalos de tempo (30 minutos, 1 hora, 3, 6, 9 e 24 horas) após da injeção das toxinas. A determinação do edema produzido foi calculada baseada na porcentagem de edema produzido, mediante comparação entre o aumento em volume da pata

inoculada com a toxina e o aumento da pata inoculada com solução de PBS. A dose mínima de formação de edema é definida como a dose de toxina que induz 30% de edema (Lomonte *et al*, 1993).

### 3.5.3 Atividade neurotóxica em preparação muscular biventer cervicis de pintainho

A preparação foi isolada e montada conforme descrito por Ginsborg e Warriner (1960). Os animais (pintainhos) foram anestesiados com alotane e sacrificados por sangramento. O músculo *biventer cervicis* foi removido e montado sob uma tensão de 1 g em 5 ml de banho órgão (Automatic organ multiple-bath LE01 Letica Scientific Instruments. Barcelona, Spain) a 37 <sup>o</sup>C contendo solução Krebs (pH 7,5) aerada (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 glicose 11,65.

Um eletrodo bipolar de anel de platina foi colocado ao redor do tendão o qual recorre o músculo inervado. Estimulação direta foi realizada com um estimulador (MAIN BOX LE 12404 Panlab s.l. Powerlab AD Instruments Barcelona, Spain) em presença de *d*-tubocurarina (*d*-Tc, 4  $\mu$ g/ml) sob as seguintes condições: 0,1 Hz, 0,2 ms, 20-30 V. Para a estimulação indireta, as condições foram: 0,1 Hz. 0,2 ms, 5-6 V.

Quando a *d*-Tc foi usada, a preparação inicialmente foi incubada sob estimulação indireta até obter bloqueio total, a seguir a voltagem foi aumentada até o nível indicado da estimulação direta para obter resposta muscular adequada.

Após da adição das toxinas (0,2ml; em concentração final de 20 μg/ml), as contrações musculares (até 120 minutos) foram registradas via transdutor de força isométrico (Modelo MLT0201 Force transducer 5mg-25g Panlab s.l. AD Instruments Pty Ltd. Spain) acoplado a um registrador PowerLab/4SP (OUAD Bridge AD Instruments, Barcelona, Spain).

Antes da adição de cada dose de PLA<sub>2</sub> ou PLA<sub>2</sub> homóloga, foi testada a resposta a Acetilcolina (ACh; 55 e 110  $\mu$ M por 60 s) e K<sup>+</sup> (KCl 13,4 mM por 130 s), na ausência da estimulação de campo. Para os experimentos controle, 0,2 ml da solução Krebs foi acrescentada no banho órgão (Prianti *et al*, 2003).

## 3.5.4 Determinação da dose letal média (DL<sub>50</sub>) via intracerebroventricular

Diferentes concentrações das toxinas (1; 2,5; 10µg) dissolvidas em 10 µl de tampão PBS foram injetadas via intracerebroventricular (i.c.v.) em grupos de 5 camundongos machos de 18 a 20g de peso, anestesiados com éter usando-se microseringas Hamilton (Gutierrez *et al*, 1986). Um

grupo controle recebeu injeção de PBS e a sobrevivência dos animais foi avaliada 24 horas após a aplicação das toxinas.

Para o cálculo da DL<sub>50</sub> foi utilizado o método de Probits (World Health Organization, 1981).

## 3.6 Análise Estatística

Os resultados são reportados como a média  $\pm$  erro padrão. A significância foi obtida através do teste t-student 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 da fração BbIII a partir do veneno de *B. brazili* em cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-75

O veneno total de *B. brazili* (600mg) foi submetido a uma etapa cromatográfica, usando-se uma coluna de Sephadex G-75 (Kontex Flex Column 78 X 2cm).

A coluna foi previamente equilibrada com tampão AMBIC 0,2M pH 8. 50 mg de veneno total foram dissolvidos e homogeneizados em 1 ml de AMBIC 1M, o extrato total foi clarificado centrifugando a amostra a 9000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi aplicado na coluna cromatográfica e a eluição realizada usando-se o tampão de equilíbrio (AMBIC 0,2M pH 8).

O perfil cromatográfico mostra a presença de quatro frações protéicas principais denominadas BbI, BbII, BbIII e BbIV, como ilustrado na Figura 7. A atividade PLA<sub>2</sub> é encontrada nos tubos 52 ao 68 ( $\vdash$ ), que corresponde à fração BbIII, a qual representa 34,75% do veneno seco total. A fração BbI apresenta atividade proteolítica, a BbII atividades proteolítica, fibrinolítica e hemorrágica.



**Figura 7** Cromatografia de exclusão molecular de veneno de *B. brazili* em coluna de Sephadex G-75. O veneno foi eluído com tampão AMBIC (0,2M pH 8) a um fluxo constante de 0,25ml/min e monitorado a 280 nm. A fração BbIII ( $\mid$ ) é a única que mostra atividade PLA<sub>2</sub>.

# 4.2 Purificação das frações: BbTX-I, BbTX-II, BbTX-III e BbTX-IV a partir da fração BbIII em HPLC de fase reversa

A fração BbIII anteriormente obtida foi submetida a mais uma etapa de purificação em HPLC de fase reversa. A corrida foi realizada em uma coluna Shim Pack CLC-ODS(M) C18 (4,6 mm x 25 cm) analítica, acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa 991–PDA. O perfil cromatográfico, como mostra a Figura 8, apresenta 10 frações majoritárias denominadas BbIII-1 a BbIII-10.

Atividade farmacológica (miotoxicidade) foi encontrada nas frações BbIII-3 (□) e BbIII-4 (■) as quais foram renomeadas como BbTX-I e BbTX-II respectivamente. Atividade enzimática e farmacológica foi encontrada nas frações BbIII-6 (■) e BbIII-7 (□), denominadas de agora em diante como BbTX-III e BbTX-IV respectivamente.





**Figura 8** Perfil cromatográfico da fração BbIII em HPLC de fase reversa usando uma coluna Shim Pack CLC-ODS(M) C18 (4,6mm x 25cm: Waters 991-PDA). A eluição da amostra foi realizada usando-se um gradiente linear contínuo (0-100%) de concentração do tampão B. O fluxo foi mantido constante a 1ml/min e monitorado a 280 nm. As principais frações obtidas foram identificadas como BbIII-1 - BbIII-10.

# 4.3 Re-cromatografia em HPLC de fase reversa das frações: BbTX-I, BbTX-II, BbTX-III e BbTX IV isoladas do veneno de *B. brazili*

Para confirmar-se o grau de pureza, as frações anteriormente obtidas foram submetidas a uma etapa de re-cromatografia em HPLC de fase reversa nas mesmas condições. A Figura 9 mostra o perfil cromatográfico das frações BbTX-I, BbTX-II, BbTX-III e BbTX-IV, evidenciando a presença de um único pico de eluição para cada proteína. O tempo de eluição é indicado ao lado de cada pico. Os perfis mostrados evidenciam alto grau de pureza em cada uma das frações purificadas.



**Figura 9** Re-cromatografia de BbTX-I, BbTX-II, BbTX-III e BbTX-IV em HPLC de fase reversa usando uma coluna Shim Pack CLC-ODS(M) C18 (4,6mm x 25cm : Waters 991-PDA). As proteínas foram eluídas através de um gradiente linear contínuo (0-100%) de concentração do tampão B. O fluxo foi mantido constante a 1ml/min e monitorado a 280 nm.

A BbTX-III e BbTX-IV foram purificadas 1339 e 1568 vezes respectivamente, com rendimentos de 38 e 37% em relação ao veneno total. A Tabela 3 exibe um resumo das etapas do processo de purificação, assim como o cálculo de atividade específica e recuperação. Como as frações BbTX-I e BbTX-II não possuem atividade enzimática, não é possível acompanhar o processo de purificação.

Etapa de Purificação	Proteína (mg/mL)	Atividade (UE/mL)	Atividade Total (UT)	Ativividade Específica (U/mg)	Purif. (vezes)	<b>Rend.</b> (%)
Veneno Total	0,498	123,5	1482	248	1	100
SephadexG-75 (BbIII)	0,0502	188,5	1131	3755	15	76
HPLC-FR (BbTX-III)	0,0017	564,5	564,5	332 059	1339	38
HPLC-FR (BbTX-IV)	0,0014	544,5	544,5	388 929	1568	37

**Tabela 3** Tabela de recuperação e cálculo de atividade específica das frações BbTX-III e BbTX-IV isoladas do veneno de *B. brazili*.

# 4.4 Eletroforese em SDS-PAGE das frações BbTX-I, BbTX-II, BbTX-III e BbTX IV isoladas do veneno de *B. brazili*

A eletroforese em SDS-PAGE mostra que as frações BbTX-I (Figura 10, pista 2) e BbTX-II (Figura 10, pista 4) em ausência de DTT apresentam uma banda protéica *Mr* em torno de 29 kDa, e na presença de DTT (Figura 10, pistas 3 e 5 respectivamente) mostram a presença de uma banda protéica com *Mr* ao redor de 14 kDa.

As frações BbTX-III (Figura 10, pistas 6 e 7) e BbTX-IV (Figura 10, pistas 8 e 9) na ausência e presença de DTT apresentam uma banda protéica com massa relativa em torno de 14 kDa.



**Figura 10** Eletroforese em gel SDS PAGE (12,5%), corado com comassie blue em condições reduzidas com DTT (r) e não reduzidas (nr). 1) marcadores moleculares, 2) BbTX-I (nr), 3) BbTX-I (r), 4)BbTX-II (nr), 5) BbTX-II (r), 6) BbTX-III (nr), 7) BbTX-III (r), 8) BbTX-IV (nr), 9) BbTX-IV (r)

# 4.5 Determinação das massas moleculares por Espectrometria de Massas (MALDI-TOf) das frações BbTX-I, BbTX-II, BbTX-III e BbTX-IV, de *B. brazili*

Através desta análise, pode-se constatar a pureza das frações BbTX-I, BbTX-II, BbTX-III e BbTX-IV, obtidas a partir da cromatografia em HPLC de fase reversa da fração BbIII, procedente do veneno total de *B. brazili*.

As frações BbTX-I e BbTX-II apresentam massas moleculares de 13,700 kDa (Figura 11A) e 13,688 kDa, respectivamente (Figura 11B).



**Figura 11** As massas moleculares das frações BbTX-I (A) e BbTX-II (B) de *B. brazili* foram analisadas por Espectrometria de Massas, utilizando-se um Voyager DE PRO Maldi-TOF espectrômetro de massas. 1 µl da amostra em TFA 0,1% é misturada em 2 µl da matriz e analisada sob as condições seguintes: aceleração de voltagem 25 kV, o laser ajustado a 2890 mJ/com<sup>2</sup> em 300 ns e o modo de análise é linear.

As frações BbTX-III e BbTX-IV apresentam massa molecular de 13,716 kDa (Figura 12A) e 13,913 kDa respectivamente (Figura 12B).

De acordo com o tipo de técnica empregada de espectrometria de massas (*MALDI-TOf*) (Figura 12), pode-se apreciar a presença de outros dois picos a mais, um de massas em torno de 6800 Da e outro de 27000 Da respectivamente. O primeiro pico representa a massa real dividida por dois, mais um próton (H<sup>+</sup>), e o segundo pico a massa real vezes dois, referindo-se à formação de um dímero (2X), o que confirma que os parâmetros empregados na determinação de tipo linear são adequadamente calibrados com o respectivo calmix, de acordo com a massa a determinar.



**Figura 12** As massas moleculares das frações BbTX-III (A) e BbTX-IV (B) de *B. brazili* foram analisadas por Espectrometria de Massas, utilizando-se um Voyager DE PRO Maldi-TOF espectrômetro de massas. 1  $\mu$ l da amostra em TFA 0,1% é misturada em 2  $\mu$ l da matriz e analisada sob as condições seguintes: aceleração de voltagem 25 kV, o laser ajustado a 2890 mJ/com<sup>2</sup>, em 300 ns e o modo de análise é linear.

# **4.6** Determinação da atividade PLA<sub>2</sub> do veneno total, e as frações BbTX-I, BbTX-II, BbTX-III e BbTX-IV do veneno de *B. brazili*

A medida da atividade PLA<sub>2</sub> foi realizada segundo Cho e Kézdy (1991), Holzer e Mackessey (1996) e adaptado para micro-placa por Ponce-Soto *et al* (2006) usando o NOAB [ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico] como substrato cromogênico.

A atividade PLA<sub>2</sub> é expressa como velocidade inicial de reação ( $V_0$ ) O valor de atividade para o veneno total de *B. brazili* é de 2,47 ± 0,25 nmoles/min (Figura 13). As frações BbTX-III e BbTX-IV com atividades de 11,29 ± 0,59 e 10,89 ± 0,49 nmoles/min respectivamente mostram maior atividade enzimática quando comparadas com a atividade do veneno total e com as frações BbTX-I e BbTX-II, as quais apresentam atividade desprezível, com valores abaixo de 0,2 nmol/min.

Estas duas frações: BbTX-III e BbTX-IV corresponderiam com enzimas PLA<sub>2</sub> D49 por elas apresentarem alta atividade catalítica sobre o substrato NOAB. As frações BbTX-II e BbTX-III (\*) são consideradas na caracterização físico-química e farmacológica.



**Figura 13** Atividade PLA<sub>2</sub> proveniente do veneno total de *B. brazili* (VT), e as frações BbTX-I, BbTX-II, BbTX-III e BbTX-IV, utilizando o substrato cromogênico NOAB. (\*) Proteínas a serem consideradas na caracterização bioquímica e biológica. (n=3)

## 4.7 Estudos da cinética enzimática da fração BbTX-III isolada do veneno de B. brazili

## 4.7.1 Efeito do pH na atividade enzimática da fração BbTX-III

A Figura 14 mostra o efeito da variação do pH sobre a atividade enzimática da fração BbTX-III. A maior atividade  $PLA_2$  para esta toxina ocorre no pH 8, sendo inativa a pHs maiores de 9 e menores do que 7.



**Figura 14** Efeito do pH sobre a atividade enzimática da fração BbTX-III isolada de veneno de *B. brazili*. (n=3)

#### 4.7.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática da fração BbTX-III

A temperatura ótima da fração BbTX-III está próxima a 37°C, conforme ilustrado na Figura 15, mas aos 40 e 45 °C ainda mantém uma alta atividade enzimática.



**Figura 15** Efeito da temperatura na atividade enzimática da fração BbTX-III isolada de veneno de *B. brazili*. (n=3)

## 4.7.3 Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática da fração BbTX-III

O efeito da concentração do substrato ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico (NOAB) na atividade PLA<sub>2</sub> de BbTX-III mostra que esta fração apresenta cinética sigmoidal no gráfico velocidade em função da concentração de substrato, principalmente a baixas concentrações (Figura 16, gráfico interno).



**Figura 16** Efeito da concentração do substrato [ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico] NOAB na atividade  $PLA_2$  de BbTX-III, isolada de veneno de *B. brazili*. O ensaio foi realizado variando-se a concentração de substrato. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão. Gráfico interno: detalhes a baixa concentração de substrato.

# 4.7.4 Determinação de $K_m$ e $V_{max}$ a partir do gráfico duplo recíproco de Lineawever-Burk da fração BbTX-III

A Figura 17 mostra o gráfico de Lineweaver-Burk para obtenção dos dados cinéticos. Nestas condições, o valor da constante  $K_m$  é 1,876 mM e  $V_{max}$  7,037 nmoles/min para BbTX-III.



**Figura 17** Gráfico de Lineawever-Burk, na determinação de Km e Vmax da fração BbTX-III isolada de veneno de *B. brazili*. (n=3)

## 4.7.5 Efeito dos íons divalentes na atividade enzimática da fração BbTX-III

A atividade enzimática da fração BbTX-III foi verificada na presença de alguns íons divalentes, tais como  $Mn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  na concentração de 10mM, e também na ausência e presença de  $Ca^{+2}$  nas concentrações de 1 e 10mM.

A Figura 18 mostra a influência dos íons divalentes na atividade PLA<sub>2</sub>. BbTX-III exibe dependência de  $Ca^{+2}$ . O aumento de atividade enzimática é de 6 e 7 vezes para 1 e 10mM de  $Ca^{2+}$  respectivamente em relação a ausência de cálcio.

A mudança completa de  $Ca^{2+}$  10mM para  $Cd^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ou  $Mn^{+2}$  reduz a atividade para níveis similares aos observados em ausência de  $Ca^{+2}$ . Na presença de  $Ca^{+2}$  em baixas concentrações (1mM), a adição de  $Mn^{+2}$  ou  $Mg^{+2}$  (10mM) mantém ou inibe pouco a atividade enzimática, no entanto,  $Cd^{+2}$  ou  $Zn^{+2}$  resultam em inibição quase completa.



**Figura 18** Efeito dos íons  $Mn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  sobre a atividade enzimática da fração BbTX-III isolada de veneno de *B. brazili*, na presença e na ausência de cálcio. (n=3)

# 4.8 Análise de composição de aminoácidos das frações BbTX-II e BbTX-III isoladas do veneno de *B. brazili*

Com relação à análise da composição de aminoácidos, a Tabela 4 mostra que BbTX-II e BbTX-III se tratam de proteínas de caráter básico com pI 8,73 e 8,46 respectivamente. Os aminoácidos básicos (His, Lys e Arg) representam 20,64% dos aminoácidos totais para BbTX-II e 23,15% para BbTX-III. As duas frações possuem quantidades similares de aminoácidos hidrofóbicos (33,7% e 33,87% respectivamente). As frações apresentam 121 resíduos de aminoácidos com presença de 14 cisteínas. Todas estas características sugerem que as frações BbTX-II e BbTX-III se tratem de enzimas PLA<sub>2</sub> devido a sua semelhança físico-química com este grupo de proteínas.

Aminoácido	BbTX-II	BbTX-III
Asx	10	9
Glx	9	8
Ser	3	5
Gly	6	7
His	3	3
Arg	9	7
Thr	7	6
Ala	8	4
Pro	11	7
Tyr	9	10
Val	3	5
Met	1	1
Cys	14	14
Ile	2	4
Leu	6	10
Phe	3	3
Lys	13	18
Trp*		
Total	121	121

**Tabela 4** Composição de aminoácidos das frações BbTX-II e BbTX-III isoladas de veneno de *B. brazili*. Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteína. (\*) não determinado

# **4.9 Estudo de seqüência e homologia das frações BbTX-II e BbTX-III isoladas do veneno de** *B. brazili*

A seqüência completa da fração BbTX-II foi determinada por análise automática de Edman da proteína reduzida e carboximetilada, assim como dos peptídeos obtidos da digestão com a protease V8 de *Staphilococcus aureus*. A seqüência da fração BbTX-II está composta de 121 resíduos de aminoácidos e possui o aminoácido Lys na posição 49 (Figura 19), o que revela que a BbTX-II corresponde a uma PLA<sub>2</sub> K49.

O estudo de homologia da BbTX-II de *B. brazili* com outras PLA<sub>2</sub> K49 provenientes de veneno de serpentes da família Viperidae mostra uma alta similaridade, de até 92,9% (Figura 19). O alinhamento da estrutura primária foi feito segundo a posição dos resíduos de cisteína. A região encerrada da figura representa a seqüência consenso entre as diferentes PLA<sub>2</sub> K49 provenientes de serpentes, indicando tanto regiões altamente conservadas quanto variáveis. Os traços (-) correspondem aos gerados pelo software usado no alinhamento para maximizar a homologia da seqüência.

								10									20								3	0								40			
BbTX_II	S I	LF	E	L	GΗ	ΚM	Ι	Ĺ	Q	Е	Т	GΚ	I N	Ρ	A	К	Ś '	Y G	ĴΑ	Y	G	С	Y I	СС	ΞV	'L	G	R	G	K	ΡK	D	A	Ť.	D	11	
MTX_II	S I	LF	'Q	L	GΗ	ΚM	Ι	L	Q	Е	Т	GΚ	ΞN	Ρ	Α	A	S '	Y G	βA	Y	G	C	Ν	СС	ΞV	Ľ	G	R	G	K	ΡK	D	A	T I	D 4	11	
BhTX_I	S I	LF	E	L	GΗ	ΚM	Ι	L	Q	Е	Т	GΚ	ιN	Ρ	A	K	S '	Y G	ΞÀ	Y	G	C	Ν	СС	<u> </u>	Ľ	G	R	G_	K	ΡK	D	A	Т :	D   4	11	
BaTX	S I	L_F	Έ	L	GΗ	ΚM	I	L	Q	Е	Т	GΚ	ιN	Ρ	A	К	S '	Υœ	ĴΑ	Y	Y	С	Y I	СС	GΜ	I G	G	Q	G	Q	ΡK	D	A	ΤÏ	D   4	11	
Cr_5	S I	LV	Έ	L	GΗ	ζM	Ι	L	Q	Е	Т	GΚ	ΞN	Ρ	A	К	S_'	<u>r</u> c	ĴΑ	Y	G	C	N	СС	ΞV	'L	G	R	Н	K	ΡK	D	A	<u> </u>	D   4	11	
Bp_12	S I	LF	Έ	L	GΗ	ζM	I	L	Q	Е	Т	GΚ	ΙN	Ρ	A	К	S ]	. Le	ΞÀ	F	Y	С	Υı	CC	ΞŴ	I G	S	δſ	G	δΓ	ΡK	. D	A	] V [:	D 4	11	
					,	k	50	)								(	50								7	0								80			
BbTX II	R	СС	Y	V	Ηŀ	< C	Ċ	Y	K	– [	L '	ΤG	; C	D	Ν	К	ΚI	< I	R	Y	S	Y	SI	NK	ĊĹ	K	Т	Ι	V	С	GΕ	N	Ν	P	<u> </u>	31	
MTX II	R	СС	Y	V	Ηŀ	<[-	lс	K	K	_	L	ΤG	÷ċ	D	Ρ	K	кГ		- R	Y	S	Y	SI	Nŀ	< E	K	Т	_	_	_		_	_		- 6	59	
BhTX_I	R	СС	Y	V	Ηŀ	ςЪ	С	Υ	K	K	L	ΤG	; C	Ν	P	Κ	K .	- [I	) R	Y	S	Y	S I	WF	< D	K	Т	Ι	V	С	GΕ	N	Ν	P	C 8	31	
BaTX	R	сс	Y	V	Ηŀ	СC	С	Y	K	K	L	ΤG	; C	Ν	Ρ	Κ	K .	-   I	R	Υ	S	Y	S I	Wŀ	< D	K	Т	Ι	V	С	GΕ	N	Ν	S	c  8	31	
Cr_5	R	СС	F	V	Ηŀ	СC	С	Y	K	K	L	ΤG	; C	D	P	K	K .	- I	R	Υ	S	Y	S I	Wŀ	< D	K	Т	Ι	V	С	GΕ	Ν	Ν	P	c  8	31	
Bp_12	R (	СС	Y	V	Ηŀ	K C	С	Y	К	K	I	ΤĢ	; C	Ν	P	Κ	Κŀ	- [I	R	Y	S	Y	S I	NF	CΙ	) K	Т	L	V	С	GΕ	D	Ν	S	C 8	31	
				ŀ	<49-	-																															
							90	)							-	100								11	10								12	0		Id	(%) entity
BbTX_II	LI	ΚE	L	С	E (	СD	K	A	V	A	Ι	СI	, R	Ε	Ν	Ĺ	Νſ	ΓY	ΖN	Κ	К	Y	R'	Υŀ	ΗI	. К	Ρ	L	С	K	K_A	D	À	С	1:	21	100.0
MTX_II	- 1	ΚE	L	С	ΕC	СD	K	A	V	A	Ι	СI	. R	Е	-	-				ΓK	К	Y	R'	Υŀ	ΗL	K	Ρ	L	С	K	К				91	3	92.9
BhTX_I	LI	ΚE	L	С	E (	СD	K	A	V	A	Ι	СI	, R	Ε	Ν	L	G	ΓY	ΖN	Γĸ	К	Y	R'	Υŀ	ΗL	K	Ρ	F	С	K	ΚĀ	D	Ρ	C	1:	21	91.7
BaTX	LI	ΚE	L	С	Ε(	СD	К	A	V	A	Ι	СI	. R	Е	Ν	L	N '	ΓY	ΖN	К	К	Y	R'	ΥĽ	ΥL	K	Ρ	L	С	K	ΚA	D	A	C	1:	21	89.3
Cr_5	LI	ΚE	М	С	E (	СD	Κ	A	V	A	Ι	СI	. R	Е	Ν	L[	D]'	ΓЧ	ΖN	К	К	Y	R'	Y -	-   L	K	P	F	С	K	ΚA	D	D	С	1:	20	86.7
Bp_12	LI	ΚE	L	С	E (	СD	Κ	A	V	A	Ι	СI	. R	Е	Ν	L	N	ΓY	ζN	К	К	Y	R'	ΥI	FL	K	Ρ	L	С	K	ΚA	D	A	A	C 13	22	83.5

**Figura 19** Alinhamento da PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II de *B. brazili* com outras PLA<sub>2</sub> K49 de veneno de serpentes. Traços (-) são introduzidos para maximizar a homologia da seqüência. MTX-I de *B. brazili* (Costa *et al* 2008), BthTX-I de *B. jararacussu* (Cintra *et al* 1993), BaTX de *B. alternatus* (Ponce-Soto *et al* 2007) Cr-5 de *Calloselasma rhodostoma* (Bonfim *et al* 2006b), Bp-12 de *B. pauloensis* (Randazzo-Moura *et al* 2008). A seqüência completa da fração BbTX-III também foi determinada por análise automática de Edman da proteína reduzida e carboximetilada, assim como dos peptídeos obtidos da digestão com clostripaina e tripsina bovina. A seqüência da fração BbTX-III está composta de 121 resíduos de aminoácidos e possui o aminoácido Asp na posição 49 (Figura 20), fato que confirma que a BbTX-III corresponde a uma PLA<sub>2</sub> D49.

A estrutura primária da BbTX-III é similar a outras toxinas PLA<sub>2</sub> D49 de veneno de serpentes. A Figura 20 mostra o alinhamento com toxinas PLA<sub>2</sub> D49 representativas de veneno de serpentes da família Viperidae. O grau de similaridade de seqüência está em torno de 75% a 90%. Os resíduos de cisteína se encontram em posições idênticas com as outras PLA<sub>2</sub>, pelo que se trata de proteínas muito relacionadas. Os traços (-) correspondem aos gerados pelo software usado no alinhamento para maximizar a homologia da seqüência.

		10	20	3	0	40
BbTXIII	SLWEWO	GQMILKE	TGKNPFPY	YGAYGCYCGŴ	IGGRR <mark>K</mark> -PI	K D – A T 40
MTX_I	SLWEF	GQMILKE	TGKLPFPY	ΥGΑΥGCΥCG₩	G G R <u>R</u> G – P I	K D – A T 40
6_1	DLFEW	GQMILKE	TGKNPFPY	ΥGΑΥGCΥCG₩	1 G G R G – K P I	К D   К D   Т   41
6_2	DLWQF(	GQMILKE	TGKIPFPY	Y <u>GA</u> YGCYCG <u></u> W	I G G R G G K P I	K D – <u>G</u> T 41
Cr_IV 1	DLWEF	<u>g o</u> m i <u>l</u> k eʻ	<u>T</u> G <u>S</u> L P F P <u>Y</u>	Υ[ΤΤ]Υ G C Y C G[V	'] G G R   G G K   P I	K D – A T 41
BmTX_I	DLWQF1	N K M I K K E	VGKLPFPF	<u>YGAYGCYCG</u> W	<u>IGGR</u> GEK <u>P</u> I	<u>k D</u> – G[T] 41
		<b>*</b> 50	60	7	0	80
BbTXIII	DRCCFV	VHDCĊRY	KKLTGCPK	TNDRYSYSRI	. DYTIVCGI	EDDPC 82
MTX_I	DRCCFV	vнрсс – –				50
6_1	DRCCY	VНDСС УК	- KLTGCPK	TDDRYSYSWI	. DLTIVCGI	EDDPC 82
6_2	DRCCY	V Н D С С Y К	- KLTGCPK	TDDRYSYSWI	. D L T I V C G I	E <u>DD</u> PC 82
Cr_IV 1	DRCCFV	V H D C C Y G	- KLTGCPK_	<u>TN</u> DRYSYS <u>RI</u>	<u>. DY</u> TIVCGI	EGGPC 82
BmTX_I	DRCCFV	<u>ИНДСС</u> УК	– KLTGCPK	W D <mark>D R Y S Y S</mark> W K	UITIVCGI	EDLPC 82
		D49-				
		90	100	110	1:	20 (%) 20 Tdoptit
BUTYIII	KEICE		CEDENIPT	<u></u>		
MTY T		CDKAAAV		K K A W YAI F	V T C K K L .	79 92.4
6 1	K ELLCE (	C D K A T A V	CFRENLIGIT			K P C 121 83.5
6 2	KELCE	C D K A I A V	CFRENLGT	Y N K K Y R Y H L K		KPC 121 82.6
Cr IV 1	KOI CE	CDKAAAV	CFRENLRT	Y N K K Y R Y H L K	PFCKEPAI	ETC 122 80.2
BmTX_I	EĒICE	CDRAAAV	<u>CFYENLGT</u>	ΥΝΚΚΥΜΚΗΙΚ	P - CKKAD	YPC 121 75.2

**Figura 20** Alinhamento da PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III de *B. brazili* com outras PLA<sub>2</sub> D49 de veneno de serpentes. Traços (-) são introduzidos para maximizar a homologia da seqüência. MTX-I de *B. brazili* (Costa *et al* 2008), PLA<sub>2</sub> 6-1 e 6-2 de *B. jararacussu* (Ponce-Soto *et al* 2006), Cr-IV 1 de *Calloselasma rhodostoma* (Bonfim *et al* 2008) BmTX-I de *B. moojeni* (Calgarotto *et al* 2008).

# 4.10 Caracterização biológica da PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e da PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III isoladas do veneno de *B. brazili*

A PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e a PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III isoladas e caracterizadas físicoquimicamente do veneno total de *B. brazili* foram caracterizadas como miotoxinas de acordo com os seguintes ensaios:

# 4.10.1 Atividade miotóxica local *in vivo* de BbTX-II e BbTX-III através da determinação dos níveis de CK plasmáticos

Os estudos realizados para determinar o efeito miotóxico local da PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-I e a PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III *in vivo* foram feitos em camundongos inoculados por via intramuscular em uma concentração de 40  $\mu$ g. Os resultados mostram que os níveis de CK plasmáticos aumentam drasticamente nas primeiras 2 horas do tratamento (aumento de 5 vezes para BbTX-III e 6 vezes para BbTX-II), atingindo até níveis de 1871,83 ± 121,02 U/L de CK para BbTX-II e 1521,41 ± 98,23 U/L de CK para BbTX-III, para posteriormente voltar a níveis normais, após 9 a 24 horas. (Figura 21).



**Figura 21** Representação gráfica da atividade miotóxica local da PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e a PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III de *B. brazili*, inoculadas em camundongos de 20 g de peso. Mostra-se o curso-tempo dos níveis de creatina-quinase (CK) incrementados ao longo do tempo depois que as proteínas foram injetadas (n=5).

# 4.10.2 Atividade miotóxica sistêmica *in vivo* de BbTX-II e BbTX-III através da determinação dos níveis de CK plasmáticos

Para a indução da miotoxicidade sistêmica, 40 µg das proteínas dissolvidas em 50 µl de PBS foram injetadas em camundongos por via intravenosa (i.v).

A atividade creatina-quinase foi determinada usando 5  $\mu$ l do plasma, incubado por 3 minutos a 37°C com 200  $\mu$ l de substrato reconstituído de acordo com o protocolo do kit CK-NAC proveniente do WIENER LAB. A atividade foi expressa em unidades por litro (U/l) e definida como a fosforilação de 1  $\mu$ mol de creatina por minuto a 37°C.

*In vivo*, a PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e a PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III (Figura 22) não induzem efeito miotóxico sistêmico, já que os níveis de CK plasmático ao longo do tempo não aumentam, mostrando um comportamento semelhante ao controle.



**Figura 22** Representação gráfica da atividade miotóxica sistêmica da  $PLA_2$  K49 BbTX-II e a  $PLA_2$  D49 BbTX-III de *B. brazili*, injetadas via i.v. em camundongos de 20 g de peso. Mostra-se o curso-tempo dos níveis de creatina-quinase (CK) incrementados ao longo do tempo depois que as proteínas foram injetadas (n=5).

## 4.10.3 Determinação da atividade edematogênica da PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e da PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III isoladas do veneno de *B. brazili*

Para o estudo da atividade inflamatória, verificou-se um dos eventos que ocorre neste processo, a formação de edema. Para isto, 10  $\mu$ g de proteínas foram dissolvidas em 50  $\mu$ l de PBS, e aplicadas sob a região intraplantar da pata direita de camundongos (18 – 20 g). A pata esquerda recebeu 50  $\mu$ l de PBS como controle. As leituras foram feitas após 0,5; 1; 3; 6; 9 e 24 horas de aplicação das toxinas.

O edema é expresso como o porcentual de aumento em volume da pata direita com relação à pata esquerda. A Figura 23 mostra que a PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e a PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III induzem edema moderado uma hora após o tratamento, evidenciando o aumento na permeabilidade vascular no lugar da aplicação das toxinas.



**Figura 23** Atividade edematogênica das  $PLA_2$  K49 BbTX-II e a  $PLA_2$  D49 BbTX-III isoladas de veneno de *B. brazili* em camundongos (18-20g). Cada ponto representa a média  $\pm$  o desvio-padrão de um grupo de 5 animais.

# 4.10.4 Determinação da atividade neurotóxica *in vitro* da PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e da PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III isoladas do veneno de *B. brazili*

Neste experimento foi testada a concentração de 20  $\mu$ g/ml da PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e da PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III isoladas de veneno de *B. brazili* na preparação do músculo esquelético *biventer cervicis* de pintainho. Para a BbTX-II PLA<sub>2</sub> K49, o tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil foi de: 51 ± 2,58 min para 20  $\mu$ g/ml. A PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III produz bloqueio moderado da resposta contrátil, alcançando 50% de bloqueio aos 120 minutos do experimento.

A Figura 24 mostra a representação gráfica do bloqueio da resposta contrátil na transmissão neuromuscular na preparação *biventer cervicis* de pintainho de BbTX-II e BbTX-III. Na dose usada das toxinas, há um bloqueio irreversível após lavagem com solução de Krebs.



**Figura 24** Representação gráfica do bloqueio da resposta contrátil na transmissão neuromuscular na preparação *biventer cervicis* de pintainho (estímulo indireto) pela ação das miotoxinas BbTX-II e BbTX-III isoladas de veneno total de *B. brazili* na dose de 20  $\mu$ g/ml. Cada ponto corresponde a média  $\pm$  erro padrão de 5 experimentos. Representação gráfica de 50 % do bloqueio da transmissão neuromuscular.

# 4.10.5 Determinação da DL<sub>50</sub> via intracerebroventricular (i.c.v) da PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e da PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III isoladas do veneno de *B. brazili*

A atividade letal da PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e a PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III através de via intracerebroventricular (i.c.v.) rende valores de DL<sub>50</sub> de 134 e 115  $\mu$ g respectivamente, para camundongos de 18–20 g (7 e 6,8 $\mu$ g/g peso).

## 5. DISCUSSÃO

# 5.1 Isolamento e purificação das PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-I e BbTX-II e as PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III e BbTX-IV do veneno de *B. brazili*

O isolamento e a purificação de uma enzima se fazem com o propósito de obter frações molecularmente homogêneas que possam ser submetidas ao estudo de mecanismo de ação através de parâmetros cinéticos e atividades biológicas. Assim, é interessante conhecer características de sua estrutura e conformação obtendo detalhes acerca do seu sítio catalítico e dos sítios farmacológicos.

PLA<sub>2</sub> são proteínas pequenas, amplamente espalhadas na natureza. Sabe-se que o veneno de serpentes é uma fonte rica de PLA<sub>2</sub> e estas enzimas possuem atividades tóxicas e/ou farmacológicas como: mionecrose, anticoagulante inibição da agregação plaquetária, cardiotoxicidade, hipotensão e atividade edematogênica (Gutiérrez e Lomonte, 1997; Kini, 2003; Bonfim *et al*, 2006b; Ponce-soto *et al*, 2007b; Calgarotto *et al*, 2008).

Devido às divergências naturais e a biodiversidade destas proteínas entre as serpentes de diferentes espécies e origens geográficas, a caracterização de novas variantes de PLA<sub>2</sub> pode prover conhecimentos relevantes para entender suas relações estrutura-função.

Na América do Sul, venenos de serpentes do gênero *Bothrops* vêm sendo estudados devido a sua predominância e importância médica em países como Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela, Bolívia e Peru, já que as serpentes botrópicas são as responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos que acontecem nestes países (FUNASA, 2002).

Pouco é conhecido sobre o veneno de *B. brazili* e seus componentes. Só alguns estudos e caracterizações preliminares foram feitos em relação a uma hemorragina, miotoxina, l-amino oxidase e uma fosfolipase (Azañero *et al*, 2000, Isla *et al*, 2003, Lazo *et al*, 1998, Solis *et al*, 1999, Zeballos *et al*, 1999). Recentemente foram estudadas e parcialmente caracterizadas duas miotoxinas capazes de induzir edema e citotoxicidade (Costa *et al*, 2008).

A presença de várias isoformas de PLA<sub>2</sub> no veneno de uma única espécie de serpente tem sido demonstrado ser um fato comum, por exemplo, os venenos de *Naja naja, Vipera russelli, Trimeresurus flavoviridis, Austrelaps superbus* e *Pseudechis australis* contêm mais de dez isoenzimas (Braganca e Sambray, 1967; Vishwanath *et al*, 1987, 1988; Takasaki *et al*, 1990; Ogawa *et al*, 1992; Subburaju e Kini, 1997; e Singh *et al*, 2000), assim como *Crotalus durissus terrificus* (Ponce-Soto *et al*, 2002; 2007a, 2007c).

Homsi-Brandeburgo *et al* (1988) isolaram e caracterizaram parcialmente duas PLA<sub>2</sub> de veneno de *B. jararacussu* que posteriormente foram chamadas como bothropstoxina-I (BthTX-I) e bothropstoxina-II (BthTX-II). Estas PLA<sub>2</sub> miotóxicas básicas têm sido caracterizadas bioquimicamente e demonstrado serem PLA<sub>2</sub> K49 e PLA<sub>2</sub> D49 respectivamente descritas por Cintra *et al.*, 1993. Com relação à PLA<sub>2</sub> D49, hoje se sabe que se trata de duas isoformas de PLA<sub>2</sub> denominadas como PLA<sub>2</sub> 6-1 e 6-2 (Ponce-Soto *et al.*, 2006). A obtenção dessas duas isoformas foi possível com a utilização de sistemas de HPLC. A possível co-eluição destas PLA<sub>2</sub> "contaminantes" poderia exibir efeitos farmacológicos ambíguos, fato que exige o emprego de métodos de purificação mais seletivos que possam garantir frações com um alto grau de homogeneidade molecular.

Neste trabalho apresentamos resultados que demonstram a presença de quatro PLA<sub>2</sub> básicas no veneno de *B. brazili*, duas PLA<sub>2</sub> D49 e duas PLA<sub>2</sub> K49. Para estas proteínas, foram purificadas e caracterizadas algumas de suas propriedades físico-químicas e biológicas.

As PLA<sub>2</sub> de veneno botrópico têm sido exaustivamente purificadas usando uma combinação de métodos cromatográficos como exclusão molecular, troca iônica, HPLC de fase reversa e afinidade usando inibidores naturais, anticorpos e heparina. (Gutierrez e Lomonte, 1997; Geoghegan *et al*, 1999; Ownby *et al*, 1999: Andrião-Escarso *et al*, 2002).

O objetivo é encontrar a técnica mais refinada ou a melhor combinação de técnicas cromatográficas que permitam isolar as PLA<sub>2</sub>, mantendo as propriedades destas, tais como sua atividade enzimática e suas atividades biológicas, além de fornecer material com alto grau de homogeneidade molecular e quantidades razoáveis para a realização dos experimentos propostos. Neste intento, Tsai *et al*, (2000), trabalhando com a serpente asiática *Calloselasma rhodostoma*, mostraram uma combinação eficiente entre cromatografía de exclusão molecular (Superdex G75 HR 10/30 Pharmacia, Sweden) e fase reversa (C8 sílica gel, Vydac 14 x 250 mm). Ponce-Soto *et al* (2007b), com a mesma combinação de técnicas, isolaram a BaTX, uma nova Lys 49, a partir do veneno de *B. alternatus*.

As PLA<sub>2</sub> K49 e as PLA<sub>2</sub> D49 de veneno de *B. brazili* foram purificadas usando um procedimento simples e rápido envolvendo duas etapas cromatográficas, exclusão molecular em Sephadex G-75 e HPLC de fase reversa (C18) (Figuras 7 e 8 respectivamente). O uso de AMBIC (Sephadex G-75) e acetonitrila (HPLC-FR) como tampões têm a vantagem de que são facilmente eliminados por liofilização, eliminando a necessidade de tirar o sal (dessalinizar) no caso de uso de acetato como tampão.

Nossos resultados utilizando cromatografia de exclusão molecular convencional mostram que o veneno de *B. brazili* pode ser decomposto em quatro frações (BbI – BbIV). Atividade PLA<sub>2</sub> é encontrada apenas no pico BbIII (Figura 7). A cromatografia HPLC de fase reversa da fração BbIII nos permite isolar 10 frações (Figura 8). Destas frações, as BbIII-6 e BbIII-7 mostram atividade PLA<sub>2</sub> e foram identificadas como PLA<sub>2</sub> D49; para melhor identificação passaram a ser denominadas como BbTX-III e BbTX-IV respectivamente. As frações BbIII-3 e BbIII-4 mostraram ausência de atividade enzimática, mas possuíam atividade farmacológica; posteriormente foram identificadas como PLA<sub>2</sub> K49, sendo denominadas BbTX-I e BbTX

Foi possível acompanhar o processo de purificação das PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III e BbTX-IV, as duas mostrando alta atividade específica (332059 e 388929U/mg respectivamente), ao redor de 1400 vezes mais do que o veneno total (Tabela 3). O rendimento neste processo é de 38% no caso da BbTX-III e 37% para BbTX-IV, valores muito maiores do que o obtido por Fuly *et al*, (2002) (5%) que, utilizando a mesma combinação de etapas (filtração gel e HPLC-FR), purificaram a PLA<sub>2</sub> ácida, denominada LM-PLA<sub>2</sub>-II, a partir de veneno de *Lachesis muta*.

Nossos resultados mostram que a combinação da cromatografia de exclusão molecular com HPLC de fase reversa foi eficiente, principalmente a etapa de HPLC-FR que se mostrou bastante efetiva, proporcionando um grande aumento na atividade específica, em função da grande redução na concentração de proteína. Além disso, há preservação da seletividade e da capacidade de resolução e do alto grau de homogeneidade molecular e atividade biológica.

Estas quatro frações (BbTX-I, BbTX-II, BbTX-III e BbTX-IV) são re-purificadas em HPLC de fase reversa nas mesmas condições. O perfil cromatográfico mostra a presença de um único pico de eluição para cada fração (Figura 9), confirmando alto grau de homogeneidade molecular das proteínas.

Para se confirmar o grau de pureza das proteínas, recorremos a diferentes técnicas de sensibilidades variadas (eletroforese, espectrometria de massa, análise de aminoácidos). A determinação da massa molecular por eletroforese SDS-PAGE, gel filtração, assim como pelo ponto isoelétrico (pI), incluindo a determinação da seqüência N-terminal, garantem a pureza no isolamento. A escolha de uma "ótima" metodologia que possa empregar uma cromatografia em HPLC e espectrometria de massas poderia ser útil na determinação da homogeneidade molecular.

As interações proteína-proteína entre PLA<sub>2</sub>, assim como o estado de agregação, dificulta o isolamento. As PLA<sub>2</sub> interagem com outras proteínas ou enzimas, as quais contribuem na atividade enzimática e farmacológica (Condrea *et al*, 1970). Em alguns casos, a formação de complexo é importante para a potência farmacológica e toxicidade das PLA<sub>2</sub>, como é o caso da crotoxina (PLA<sub>2</sub>)

e crotapotina). No caso das PLA<sub>2</sub> em estudo, o perfil eletroforético mostra que as PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III e BbTX-IV, na ausência e presença de DTT, apresentam uma banda protéica com massa relativa em torno de 14 kDa. Já as PLA<sub>2</sub> K49: BbTX-I e BbTX-II, em ausência de DTT, apresentam uma banda protéica com Mr de 29 kDa, e na presença de DTT mostram a presença de apenas uma banda protéica com Mr de 14 kDa (Figura 10). Esta condição de formar agregados dímeros é uma característica típica das PLA<sub>2</sub> (Bonfim *et al*, 2006a, 2006b; Ponce-Soto *et al*, 2007a, 2007b, 2007c), proporcionando um efeito conhecido como cooperatividade, também característico de enzimas alostéricas, o que reforçaria a possibilidade de esta enzima ter um comportamento com tendência alostérica.

A espectrometria de massa é uma técnica analítica mais exata, porém menos acessível, na qual deve constar apenas um íon molecular ou os derivados da sua clivagem. A espectrometria de massa por MALDI-TOf confirma a pureza das quatro proteínas e mostra que possuem massas moleculares em torno de 13800 Da (Figuras 11 e 12), essas massas moleculares são características das PLA<sub>2</sub> provenientes do veneno de serpentes (Ponce-Soto *et al*, 2007a, 2007b).

# 5.2 Caracterização físico-química da PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e da PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III isoladas do veneno de *B. brazili*

Com respeito à caracterização físico-química das proteínas em estudo, existem várias técnicas que facilitam nossa compreensão sobre a estrutura destas proteínas, tudo isto com a finalidade de entendermos melhor seu funcionamento.

Vários trabalhos mostram que PLA<sub>2</sub> de veneno de serpentes tem a tendência de se agrupar e formar agregados como dímeros, trímeros, tetrâmeros (Arni *et al*, 1995) e vários estudos cinéticos são compatíveis com modelos nos quais as PLA<sub>2</sub> formam dímeros ou oligômeros para exibir atividade enzimática total (Cho *et al*, 1988; Tomasselli *et al*, 1989). No entanto, essa não é uma condição obrigatória, pois as formas monoméricas também hidrolisam eficientemente os substratos, como é o caso da notexina (Halpert e Eaker, 1975), ammoditoxina (Ritonja e Gubensek, 1985) e agkistrodotoxina (Kondo *et al*, 1989), LmTX-I (Damico *et al*, 2006).

Foram analisados os parâmetros cinéticos da PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III. A atividade PLA<sub>2</sub> mostra ser maior em BbTX-III (11,29  $\pm$  0,59 nmoles/min) quando comparada com o veneno total (7,74  $\pm$  0,25 nmoles/min) (Figura 13). Enzimas PLA<sub>2</sub> de veneno de serpente geralmente mostram o comportamento clássico de Michaelis-Menten, hidrolisando substratos sintéticos na posição 2 e atacando preferencialmente substratos em estado micelar (Breithaupt, 1976). As PLA<sub>2</sub> hidrolisam fosfolipídios em capas lipídicas micelares ou monoméricas, apresentando incrementos grandes na sua atividade catalítica (até 10 000 vezes) quando os fosfolipídios monoméricos agregam-se formando micelas perto da sua concentração micelar crítica (Verheij *et al*, 1981). Isto é devido a uma boa eficiência de catálise interfacial que depende da absorção da enzima na interface lipídio-água, promovida fortemente pela presença de moléculas aniônicas anfipáticas dentro da membrana (Schiavo *et al*, 2000).

Todas as PLA<sub>2</sub> descritas na literatura são altamente estáveis e resistentes ao calor, ácidos e uréia, mas a atividade catalítica é perdida em valores de pH altos. Quando são usados substratos micelares, a atividade catalítica máxima ocorre a pH 7 – 8 e 35 - 45°C de temperatura (Breithaupt, 1976, Holzer e Mackessy, 1996). Atividade PLA<sub>2</sub> da BbTX-III foi verificada em diferentes valores de pH, encontrando atividade enzimática ótima em pH 8 (Figura 14). A temperatura é outro parâmetro cinético utilizado para caracterizar as PLA<sub>2</sub>. Tem sido demonstrado que a PLA<sub>2</sub> da serpente *Naja naja naja* é muito estável a temperaturas elevadas, tais como 100 °C (Kini, 1997). A temperatura ótima para BbTX-III está em torno de 37 °C, no entanto, entre 40 e 45 °C a atividade ainda mantinha-se elevada, indicativo da alta estabilidade da molécula ao calor (Figura 15).

A BbTX-III é uma enzima monomérica mas o comportamento não é hiperbólico como seria esperado, pelo contrário é uma curva sigmóide (Figura 16, principalmente a baixas concentrações), o que é típico das enzimas alostéricas com múltiplos centros ativos e operando de modo cooperativo. A cinética sigmóide da BbTX-III, que tem apenas um centro ativo pode ser devida a alteração de confromação induzida pelo substrato de modo que ao final do ciclo catalítico a enzima mantém uma alta afinidade pela seguinte molécula de substrato. Este tipo de comportamento observado concorda com os resultados obtidos por Calgarotto *et al*, (2008) para a PLA<sub>2</sub> nomeada BbTX-I isolada de veneno de *Bothrops moojeni*, Bonfim *et al*, (2006a) para a PLA<sub>2</sub> Bj-V isolada de veneno de *B. jararacussu* e Damico *et al*, (2005) para a PLA<sub>2</sub> LmTX-I de veneno de *Lachesis muta muta*, todos utilizando o mesmo substrato aqui descrito.

Como vemos, as PLA<sub>2</sub> de venenos crotálicos mostram comportamento similar às PLA<sub>2</sub> D49 presentes nos venenos botrópicos, como é o caso nos estudos cinéticos da PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III (Beghini *et al*, 2000; Ponce-Soto *et al*, 2002). As PLA<sub>2</sub> botrópicas e crotálicas apresentam diferenças estruturais e funcionais, mas possuem cinética enzimática com tendência alostérica. Os valores de K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> indicam uma alta afinidade da enzima frente ao substrato NOAB, quando comparadas com esses valores de outras PLA<sub>2</sub> D49 de veneno botrópco e crotálico (Ponce-Soto *et al.*, 2002; Toyama *et al.*, 1995).

A atividade enzimática da PLA<sub>2</sub> D49: BbTX-III é completamente dependente de Ca<sup>+2</sup> (Figura 18). Como se observa, BbTX-III precisa de baixas concentrações de Ca<sup>+2</sup> para conseguir atividade total, não é observada diferença significativa de atividade enzimática entre 1 e 10 mM de cálcio, o que está de acordo com os resultados obtidos por Shiomi *et al* (1998) e Ponce-Soto *et al*, (2002). No entanto, a adição de outros íons divalentes (Mg<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>) na presença e ausência de Ca<sup>+2</sup> inibe a atividade PLA<sub>2</sub>; já o Cd<sup>+2</sup> e Zn<sup>+2</sup> reduzem marcadamente a atividade enzimática de BbTX-III, indicando que estes cátions não podem substituir o Ca<sup>2+</sup>. Beghini e colaboradores (2000) observaram o mesmo para PLA<sub>2</sub> do veneno de *C. durissus cascavella*. O íon Ca<sup>2+</sup> direciona o posicionamento do substrato no sítio ativo da enzima e parece que esse arranjo do sítio catalítico apresença de outros íons. O requerimento estrito de cálcio é uma característica comum das PLA<sub>2</sub> de várias fontes (Dennis, 1994; Arni e Ward, 1996). BbTX-III mostra a típica dependência de cálcio para expressar atividade, semelhante a outras PLA<sub>2</sub> D49. Calgarotto *et al*, (2008) observaram o mesmo comportamento para a PLA<sub>2</sub> D49 BmTX-I de *B. moojeni*.

A composição de aminoácidos das toxinas BbTX-II (PLA<sub>2</sub> K49) e BbTX-III (PLA<sub>2</sub> D49) mostra a presença de uma grande quantidade de aminoácidos tanto de caráter básico (20 e 23%) quanto hidrofóbico (33%); a presença de 14 Cys é indicativo de 7 pontes dissulfeto, as quais estabilizam a estrutura terciária das proteínas, que estão constituídas de 121 resíduos de aminoácidos (Tabela 4), concordando com a composição e estrutura primária reportadas para miotoxinas PLA<sub>2</sub> isoladas de venenos botrópicos (Gutiérrez e Lomonte 1995, 1997; Ponce-Soto *et al*, 2006, 2007a).

A comparação da seqüência da PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II revela um alto nível de conservação dentro da família de proteínas PLA<sub>2</sub> K49. Os resultados mostram que a estrutura primária da PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II possui um alto grau de homologia seqüencial (92-83%) com outras PLA<sub>2</sub> K49 de origem botrópica (Figura 19). O alinhamento da seqüência da BbTX-II com outras seqüências completas de PLA<sub>2</sub> K49 mostra a presença de algumas mutações importantes. Assim, a PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II mostra as seguintes substituições:  $Y \rightarrow N(27)$ ,  $N \rightarrow P(58)$ , e L $\rightarrow F(114)$  (Figura 19). O fato de que estas substituições não modificam os efeitos biológicos aqui estudados revela que estas poderiam ser relacionadas com outras atividades não analisadas neste trabalho.

As enzimas PLA<sub>2</sub> K49 apresentam o aminoácido leucina na posição 5 (L5) e glutamina na posição 11 (Q-11). Este evento sugere fortemente que a BbTX-II é uma PLA<sub>2</sub> K49, diferente das PLA<sub>2</sub> D49 que possuem fenilalanina na posição 5 (F5). Em efeito, as miotoxinas K49, as quais são enzimaticamente inativas, apresentam um resíduo de asparagina na posição 28 (N28) no lugar de

tirosina (Y28), leucina na posição 32 (L32) no lugar de glicina (G32), e obviamente lisina na posição 49 (K49) no lugar de aspartato nas PLA<sub>2</sub> D49, sendo esta última a substituição decisiva para a perda de atividade catalítica.

O resíduo tirosina na posição 28 (Y28) presente nas D49 de miotoxinas ativas é importante para a flexibilidade da conformação que estrutura a cognição com o  $Ca^{2+}$  (Pereira *et al*, 1998). Na seqüência da estrutura primária da BbTX-II, foi possível encontrar tirosina na posição 28 (Y28), confirmando o que usualmente não acontece nas PLA<sub>2</sub> K49. A tirosina na posição 28 (Y28) é característica das D49 e é extremamente importante no processo de fixação de íons Ca<sup>2+</sup> nas PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativas.

Todo o aparato catalítico, incluindo a tríade catalítica (His48, Tyr52 e Asp99), o sistema de suporte da tríade (Tyr73) são conservados na estrutura da proteína BbTX-II, mas não apresentam atividade catalítica. Resultado indicativo, sugerindo que a conformação local da tríade em BbTX-II (Figure 19) não é responsável pela falta de atividade catalítica e as bases estruturais para esta deficiência funcional precisam ser investigadas.

No caso da BbTX-II, a Lys111 é encontrada na estrutura primária e pode contribuir com a interrupção da catálise. Nas enzimas PLA<sub>2</sub> D49, existe uma seqüência de resíduos de Gly, nas posições Gly26, Gly30, Gly32 e Gly33. Em BbTX-II e outras PLA<sub>2</sub> K49, esta seqüência é incompleta. A troca de Gly32 por Leu32 é a mutação comum mais notável. A presença destes resíduos de Gly e de Tyr28 é importante na conformação flexível que estrutura o sítio de ligação ao íon cálcio (Arni e Ward, 1996). Tyr28 é usualmente trocada por Asn28 em outras PLA<sub>2</sub> cataliticamente inativas. Outras atividades biológicas produzidas por PLA<sub>2</sub> isoladas não dependem da atividade catalítica. Mas o domínio C-terminal com a seqüência KKYRYYLKPL CKK, localizada nos resíduos 115 e 129 de *B. asper*, é importante para as amplas atividades biológicas destas enzimas catalíticamente inativas, e peptídeos sintéticos construídos deste segmento curto evidenciam mionecrose, atividade citolítica e efeitos bactericidas (Lomonte *et al*, 2003).

De outro lado, o estudo de homologia da seqüência da PLA<sub>2</sub> BbTX-III mostra que existem posições extremamente conservadas nas PLA<sub>2</sub> (Figura 20). Nas posições 1 e 2, predomina a seqüência de aminoácidos (SL), na posição 4 (E), na posição 7 a 10 (QMIL), na posição 12 e 13 (ET), posição 21 (Y), posição 25-26 e 28-29 (GC e CG). Nas PLA<sub>2</sub> D49, há muitos resíduos de aminoácidos conservados que também possuem funções importantes na expressão da atividade PLA<sub>2</sub>, W/YCG-G são essenciais para a formação do canal de ligação ao cálcio (Ponce-Soto *et al*, 2007 a, b; Pereira *et al*, 1998).

Os resíduos conservados Y28, G30, G32, D49, H48 e Y52 estão direta ou indiretamente ligados com a catálise da BbTX-III. Além disso, BbTX-III apresenta algumas mutações: K35 -> G35, R51 -> Y51 e D118 -> 118A que estão estrategicamente posicionadas para a expressão da atividade catalítica. Apesar destas substituições, as atividades farmacológicas e a atividade catalítica são mantidas.

# 5.3 Caracterização biológica da PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e da PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III isoladas do veneno de *B. brazili*

O envenenamento botrópico pode ser classificado segundo a presença das manifestações locais ou sistêmicas. Entre as manifestações locais estão: mionecrose, hemorragia, inflamação; e entre as sistêmicas, hemorragia, alterações na coagulação, na função plaquetária e do fibrinogênio (Hati *et al*, 1999). Estes efeitos podem ser causados por miotoxinas, desintegrinas, peptídeos vasoativos e enzimas, tais como fosfolipases A<sub>2</sub>, metaloproteases, hialuronidases, serinoproteases, etc.

As atividades farmacológicas investigadas para a PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e a PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III incluem edema de pata, miotoxicidade local e sistêmica, neurotoxicidade e DL<sub>50</sub> via intracerebroventricular. Fortes evidências mostraram que as PLA<sub>2</sub> de veneno de serpentes encontraram-se entre os principais mediadores da mionecrose (Gutierrez e Lomonte, 1995; Gutiérrez e Ownby, 2003), desgranulação de mastócitos, edema e inflamação (Texeira *et al*, 2003), miotoxicidade em mioblastos e miotubos (Angulo e Lomonte, 2005), bloqueio da atividade neuromuscular pré e pós-sináptica *in vitro* (Randazzo-Moura *et al*, 2008).

A miotoxicidade é definida como habilidade das toxinas 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 (Gutierrez e Lomonte, 1997) 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).

Os estudos comparativos da miotoxicidade induzida em nível intravenoso e intramuscular *in vivo* mostram que BbTX-II e BbTX-III de *Bothrops brazili* possuem miotoxicidade local, mas não sistêmica ao incrementar só os níveis de CK séricos naquela miotoxicidade induzida por via intramuscular, ao contrário daqueles níveis encontrados para a miotoxicidade induzida por via intravenosa, que mostraram resultados muito baixos, semelhante ao controle (Figuras 21 e 22). Este tipo de miotoxicidade é característica do veneno das serpentes Viperidae, cujas PLA<sub>2</sub> afetam predominantemente os músculos localizados na vizinhança da região onde o veneno foi injetado. (Milani *et al.*, 1997).

As miotoxinas PLA<sub>2</sub> do veneno botrópico caracterizam-se por induzir dano muscular localizado, de ação rápida, e pouca miotoxicidade adicional ocorre após esse dano inicial. Provavelmente estas PLA<sub>2</sub>, BbTX-II e BbTX-III, não têm especificidade e se unem 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 rabdomiolise.

Gutierrez e Ownby, (2003) propõem que as PLA<sub>2</sub>s miotóxicas ligam-se aos receptores da membrana plasmática, os quais poderiam se tratar de lipídios ou proteínas, podendo diferir de sua afinidade pelas PLA<sub>2</sub>. Ao se ligar, estas PLA<sub>2</sub>s miotóxicas produzem uma destruição da membrana plasmática através de mecanismos catalíticos ou mecanismos independentes de atividade PLA<sub>2</sub>. No entanto, provocam uma entrada de Ca<sup>2+</sup> bastante pronunciada e que, por sua vez, produzem uma série de eventos degenerativos associados com uma hipercontração, ativação de calpainas e PLA<sub>2</sub> citosólicas e mitocondriais Ca<sup>2+</sup>-dependentes.

PLA<sub>2</sub> miotóxicas do grupo II que induzem miotoxicidade local, compreendem as PLA<sub>2</sub> D49 cataliticamente ativas e as PLA<sub>2</sub> K49, subgrupo de PLA<sub>2</sub> que apresentam substituição na posição 49  $(D \rightarrow K)$ , em conseqüência perdem a atividade enzimática (Kaiser *et al*, 1990; Pereira *et al*, 1998). Tem sido demonstrado que estas PLA<sub>2</sub> K49 miotóxicas, embora tenham pouca ou nenhuma atividade enzimática sobre substratos sintéticos, são capazes de produzir necrose muscular, portanto a atividade farmacológica é independente da atividade catalítica (Homsi-Brandeburgo *et al*,1988; Mebs e Ownby, 1990; Gutierrez e Lomonte, 1997).

A atividade catalítica é importante para que as PLA<sub>2</sub> D49 exibam efeito miotóxico, como é reportado por Soares *et al*, (2001), que descrevem como a His48 da PrTX-III isolada de *B. pirajai* é modificada a partir de p-BPB, inibindo quase que completamente as atividades catalíticas, anticoagulante, miotóxica e citotóxica. Estes autores mostraram que a His na posição 48 é essencial para hidrólise de fosfolipídios e que estas atividades farmacológicas são dependentes da atividade enzimática. Estes dados da literatura reforçam a idéia de que a atividade enzimática pode ser importante na miotoxicidade das PLA<sub>2</sub> D49, como os exibidos pela PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III descrito neste trabalho. Porém não é essencial para a PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II (ausência de atividade catalítica) isolada no presente trabalho e injetada no músculo gastrocnêmios de camundongos, produzindo uma rápida elevação do CK plasmático semelhante à PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III, demonstrando, portanto, que estas variantes de PLA<sub>2</sub> são também importantes componentes miotóxicos no veneno de *B. brazili*, assim como acontece com a BaTX, uma PLA<sub>2</sub> K49 isolada de veneno de *B. alternatus* que é capaz de produzir miotoxicidade local e potente neurotoxicidade *in vitro* (Gutierrez *et al*, 2008; Ponce-Soto *et al*, 2007b).

A atividade miotóxica mostrada pelas PLA<sub>2</sub> K49 em ausência de atividade enzimática indica a existência de sítios farmacológicos (regiões moleculares), os quais seriam responsáveis pela atividade miotóxica. Assim, Lomonte (1994) identificou a região catiônica e hidrofóbica C terminal no segmento (115-129) do sítio de ligação da heparina como sendo responsável pela atividade citotóxica das PLA<sub>2</sub> K49. O peptídeo responsável por este sítio é capaz de lesar células endoteliais, produzir um efeito bactericida e desencadear uma necrose induzida do músculo esquelético (Lomonte *et al*, 1994; Gutiérrez e Lomonte, 1997; Páramo *et al*, 1998; Lomonte *et al*, 1999 e Núñez *et al*, 2001).

Veneno de serpentes da família Viperidae contém  $PLA_2$  do grupo II, as quais compartilham traços estruturais com as  $PLA_2$  secretoras do grupo II-A presentes em líquidos extravasados inflamatórios de mamíferos (Kaiser *et al*, 1990, Kini, 1997). Várias  $PLA_2$  de veneno têm sido demonstradas por induzir edema (Vishwanath *et al*, 1987; Lomonte *et al*, 1993), embora os mecanismos de ação destas  $PLA_2$  nos eventos inflamatórios ainda sejam pouco conhecidos.

Inflamação é o mecanismo de defesa caracterizado pelo incremento da permeabilidade vascular, edema e migração de leucócitos desde os vasos sangüíneos aos tecidos danificados pelos agentes tóxicos. Durante a fase aguda da inflamação, os neutrófilos são as primeiras células a se acumularem nos tecidos (Texeira *et al*, 2003).

A PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e a PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III induzem edema pronunciado em camundongos (Figura 23), concordante com prévias observações de atividade edematogênica de moléculas similares nos mesmos modelos biológicos (Lomonte *et al*, 1993; Landucci *et al*, 1998). Esta atividade foi tempo-dependente e atingiu a resposta máxima nos primeiros 30 min.

A formação de edema indica aumento na permeabilidade vascular do órgão ou tecido atingido pelas toxinas PLA<sub>2</sub>. Zuliani *et al* (2005) observaram que as PLA<sub>2</sub> MT-II e MT-III (PLA<sub>2</sub> K49 e PLA<sub>2</sub> D49 respectivamente) isoladas de *B. asper* induziram incremento da permeabilidade vascular na cavidade peritoneal de camundongos, indicando que o sangue extravasa devido à formação de aberturas endoteliais nos vasos sanguíneos da microcirculação. Os mediadores envolvidos neste efeito seriam mediadores vasoativos derivados de grânulos de células mastócitos.

A BbTX-III induz efeito inflamatório pronunciado (Figura 23). Pode-se inferir que a hidrólise de fosfolipídios possa ter contribuído para tal fenômeno. Esta afirmação é apoiada por estudos observando modificações químicas nas PLA<sub>2</sub> D49 com p-BPB, o qual anula a atividade catalítica e reduz drasticamente a atividade edematogênica da PLA<sub>2</sub> D49 MT-III de *B. asper* (Chaves *et al*, 1998) assim como de outras PLA<sub>2</sub> D49 (Cirino *et al*, 1989; Zuliani *et al*, 2005). De acordo com a literatura, algumas PLA<sub>2</sub>, catalíticamente ativas, desempenham função no efeito edematogênico e a PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III estudada aqui confirma esta sugestão ao induzir edema em camundongos usados como modelos biológicos.

Apesar de um possível papel da atividade enzimática no desenvolvimento de edema, no caso da BbTX-II, a atividade edematogênica observada pode acontecer através de mecanismos não relacionados com a hidrólise de fosfolipídios.

A PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II (ausência de efeito catalítico) mostrou efeito edematogênico (Figura 23), sugerindo que este efeito não está correlacionado com a atividade enzimática. Várias PLA<sub>2</sub> K49, enzimaticamente inativas, mostraram induzir edema (Lomonte *et al*, 1993; Landucci *et al*, 1998, 2000) indicando a existência de regiões moleculares (sítios farmacológicos) diferentes ao sítio catalítico destas PLA<sub>2</sub>, as quais são as responsáveis pela desgranulação de mastócitos e edema.

Com o intuito de conhecer estas regiões moleculares, foi sintetizado um peptídeo que compreende a região C-terminal da PLA<sub>2</sub> K49 nomeada MT-II isolada de veneno de *B. asper* rico em resíduos hidrofóbicos e catiônicos. Os resultados mostraram que este peptídeo foi capaz de induzir edema de pata em camundongos (Nanes *et al*, 2001), ressaltando a importância dos aminoácidos catiônicos. Atividade edematogênica de várias PLA<sub>2</sub> K49 miotóxicas de venenos botrópicos são significantemente reduzidas após modificação química de resíduos dos aminoácidos

Lys (Soares *et al*, 2000a, b) e após incubação com heparina polianiônica (Lomonte *et al*, 1994; Landucci *et al*, 2000).

Os mecanismos pelos quais os venenos induzem edema não estão claros, o que torna necessário mais estudos para investigar com detalhes se a PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III induz edema por produtos da lipoxigenase ou através de produtos da cicloxigenase (Chaves, 1995).

Com respeito aos componentes neurotóxicos de veneno de serpentes, estudos têm mostrado que venenos de várias espécies botrópicas possuem efeito neurotóxico. Cogo *et al*, (1993) mostraram que o veneno de *B. insularis* possui um efeito neurotóxico na preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho em concentrações que não afetam as respostas contraturantes a ACh e KCl e nem mesmo interferem com a liberação de CK. Posteriormente, ficou demonstrado que a fração responsável pelo efeito neurotóxico continha uma fosfolipase A<sub>2</sub> com atividade catalítica. (Cogo *et al*, 1998). De maneira similar, Ponce-Soto *et al*, (2007) mostraram o potente bloqueio da transmissão neuromuscular na preparação *biventer cervicis* de pintainho induzida pela PLA<sub>2</sub> K49 BaTX purificada de veneno de *Bothrops alternatus*.

No presente trabalho, foi avaliada a atividade neurotóxica *in vitro* da PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e da PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III, usando como modelo a preparação *biventer cervicis* de pintainho, na dose de 20 µg/ml. Os resultados mostraram que a PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e a PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III de *Bothrops brazili* foram capazes de diminuir a resposta contrátil, produzindo um bloqueio na transmissão neuromuscular (Figura 24). Vemos também que existem diferenças de bloqueio das duas toxinas, assim, a PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II, aos 51 minutos, produz o bloqueio de 50% da transmissão neuromuscular, já a PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III exibe apenas um bloqueio moderado, alcançando o 50% só no final do experimento

As neurotoxinas presentes nos venenos de serpentes que desencadeiam paralisia neuromuscular agem pré-juncionalmente, causando interferência na liberação e na síntese de acetilcolina (ACh), ou pós-juncionalmente, bloqueando os receptores para a acetilcolina. Estes diferentes mecanismos de ação podem ser diferencialmente demonstrados usando-se a preparação *biventer cervicis* de pintainho. Uma neurotoxina pré-sináptica ativa pode abolir a resposta contrátil, sem afetar as respostas aos agonistas colinérgicos ou as respostas à estimulação direta pelo KCl. Neurotoxinas ativas pós-sinapticamente bloqueiam respostas aos agonistas dos colinoreceptores, tanto quanto a estimulação indireta, mas podem não afetar as respostas a elevadas concentrações de potássio ou a estimulação direta (Harvey, 1994).

O bloqueio com 20 µg/ml de BbTX-II foi acompanhado pela inibição das respostas ao potássio (KCl) e a acetilcolina (ACh). Estas observações sugerem que, na concentração de 20
µg/ml, BbTX-II de *Bothrops brazili* teve efeito inibitório nos receptores pós-sinápticos colinérgicos, causando dano muscular e impedindo a contratura em resposta ao KCl.

Existem poucos estudos farmacológicos das PLA<sub>2</sub> K49, quando comparados às D49, que são as mais estudadas (Mebs e Ownby, 1990, Ownby, 1990; Gutierrez e Lomonte, 1997, Fletcher *et al*, 1997). Quando se realizam comparações entre as K49 e D49, tem-se a tendência de associar a atividade PLA<sub>2</sub> das duas e, no caso das PLA<sub>2</sub> K49, que são desprovidas de atividade PLA<sub>2</sub>, alguns autores consideram que estas proteínas poderiam estar ativando enzimas lipolíticas de tecido, o que seria revelado no aumento dos níveis de ácidos graxos(Ownby *et al*, 1999). Atualmente a função da atividade PLA<sub>2</sub> nos mecanismos neurotóxico e miotóxico ainda não se encontra totalmente elucidada.

Vários grupos têm previsto o sítio neurotóxico das PLA<sub>2</sub> por métodos teóricos. Dufton *et al* (1983) foram os primeiros a predizer o sítio neurotóxico responsável do efeito, através da análise de homologia direita entre PLA<sub>2</sub>  $\beta$ -neurotóxicas e não neurotóxicas. Com base nos perfis hidropáticos de PLA<sub>2</sub>, também foi previsto que a hélice hidrofóbica E pode ser importante na neurotoxicidade pré-sináptica baseada na seqüência de 26 PLA<sub>2</sub> (Kini e Iwanaga, 1986). Recentemente, a análise da seqüência de 40 PLA<sub>2</sub> neurotóxicas mostra o segmento hidrofóbico na região 80-110, embora algumas das 47 PLA<sub>2</sub> não específicas também tenham evidenciado uma hidrofobicidade similar, o que indica uma falta de correlação entre a neurotoxicidade e a hidrofobicidade (Khan, 2002). Embora existam várias outras tentativas de identificar o sítio neurotóxico pré-sináptico (Kondo *et al*, 1989; e Takasaki *et al*, 1990), a questão ainda permanece não muito clara.

Curin-Serbec *et al*, (1991), Pungercar *et al*, (1999), Ivanovski *et al*, (2000) e Prijatelj *et al*, (2000) purificaram várias isoenzimas PLA<sub>2</sub> a partir do veneno de *Vipera ammodytes ammodytes*, evidenciando uma diferença na potência neurotóxica. Da seqüência de aminoácidos na estrutura primária, de 3 Ammodytoxinas (PLA<sub>2</sub> de cadeia simples), foi identificado o sítio neurotóxico no segmento C terminal das PLA<sub>2</sub> (Krizaj *et al*, 1989). Anticorpos contra o peptídeo C terminal foi capaz de inibir os efeitos neurotóxicos da Ammodytoxina.(Curin-Serbec *et al* 1991). Este sítio é importante, mas não suficiente para a neurotoxicidade (Prijatelj *et al*, 2002 e Petan *et al*, 2002).

O teste de letalidade foi realizado para determinar a quantidade das toxinas necessária para matar a metade de uma população de animais em teste com o intuito de se verificar a potência das toxinas no veneno bruto. A PLA<sub>2</sub> K49 BbTX-II e a PLA<sub>2</sub> D49 BbTX-III evidenciam, através da rota intracerebroventricular, dose letal de 7 e 6,8µg por grama de peso, respectivamente; esta potência é parecida com outras PLA<sub>2</sub> provenientes da família Viperidae (Texeira *et al*, 2003).

Todas estas atividades farmacológicas induzidas pelas toxinas em estudo acontecem na presença e na ausência de atividade enzimática e, como vimos, embora a atividade catalítica contribua para os efeitos farmacológicos, esta não é um requisito (Chaves *et al*, 1998; Landucci *et al*, 2000; Kanashiro *et al*, 2002). Estudos adicionais são necessários para identificar as determinantes estruturais envolvidas nestas atividades biológicas.

Alguns autores propõem vários modelos para explicar a relação da atividade PLA<sub>2</sub> e as atividades farmacológicas (Kini, 2003; Gutierrez e Ownby, 2003; Ponce-Soto *et al*, 2006; Gutierrez *et al*, 2008). Nestes modelos propostos, as PLA<sub>2</sub> possuem dois sítios separados, um responsável pela atividade catalítica e outro pela expressão da atividade biológica.

Estes autores afirmam que os sítios farmacológicos poderiam ser localizados na superficie da molécula. Segundo Kini e Evans (1987), o sítio anticoagulante poderia ser localizado na região entre os resíduos 53 e 76, considerando esta região carregada positivamente. Os mesmo pesquisadores identificaram um sítio miotóxico que corresponde a uma região catiônica (+00+++00+) característica em enzimas miotóxicas, entretanto as não miotóxicas não a possuem. Este sítio catiônico estaria localizado no extremo N-terminal do canal hidrofóbico e estes dois sítios juntos formariam a região miotóxica. Uma combinação similar de sítios hidrofóbicos e catiônicos foi encontrada em miotoxinas não enzimáticas isoladas de veneno de serpentes.

Tentar determinar os fatores responsáveis das atividades farmacológicas com base nas comparações das seqüências e na distribuição característica de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos ajuda no entendimento da presença de domínios para tais efeitos farmacológicos. No entanto, é preciso ter todas estas informações ligadas com outras características físico-químicas de estudos cristalográficos, dicroísmo circular ou mutagênese dirigida. Todos estes dados nos permitem conhecer e entender melhor estas proteínas (Kini e Iwanaga, 1986; Kini e Evans, 1987; Arni e Ward, 1996).

Perspectivas do trabalho.

Estudos com modificações químicas em resíduos de aminoácidos que fazem parte do sítio catalítico nos ajudariam a confirmar se a atividade enzimática da BbTX-III está diretamente envolvida com as atividades farmacológicas observadas. Assim também, estudos de citotoxicidade em linhas celulares de mioblastos e miotubos confirmaria a inespecificidade farmacológica observada tanto para BbTX-II quanto para BbTX-III.

# 6. CONCLUSÕES

As enzimas PLA<sub>2</sub> provenientes de veneno de serpentes são intensamente estudadas devido a que os envenenamentos constituem um dos principais problemas de saúde em muitos paises. Por outro lado, estas toxinas ajudam a revelar aspectos desconhecidos da fisiologia celular e tisular.

No presente trabalho, purificamos e caracterizamos estrutural e funcionalmente duas PLA<sub>2</sub> do veneno de *Bothrops brazili*, uma PLA<sub>2</sub> D49 nomeada BbTX-II e uma PLA<sub>2</sub> K49 nomeada BbTX-III.

Ao longo da caracterização físico-química estas duas toxinas mostraram diferenças estruturais. BbTX-II tem massa molecular de 13,8 kDa, é uma proteína básica, não pussui atividade catalítica e a presença de um resíduo de Lys na posição 49 revela que pertence á família das PLA<sub>2</sub> K49. BbTX-III é de caráter básico, possui massa molecular de 13,7 kDa, o resíduo Asp na posição 49 na estrutura primária revela que BbTX-III pertence á família das PLA<sub>2</sub> D49, enzimáticamente ativas. BbTX-III é Ca<sup>2+</sup> dependente, tem atividade ótima em pH 8, 37°C e na presença do substrato NOAB mostra tendência alostérica, principalmente em baixas concentrações.

Estas PLA<sub>2</sub> BbTX-II e BbTX-III, mostraram ser miotoxinas com atividade edematogênica e neurotóxica independentemente de apresentarem atividade catalítica (BbTX-III) ou não (BbTX-II). Esses resultados apóiam a hipotese da existência de regiões moleculares distintas da catalítica, que são as responsáveis pelos eventos farmacológicos apresentados tanto pelas PLA<sub>2</sub> D49 quanto pelas PLA<sub>2</sub> K49.

O desempenho dos efeitos farmacológicos da toxina BbTX-III provavelmente tenham um estrita relação entre a atividade PLA<sub>2</sub> e a ligação da toxina com microdominios da membrana plasmática onde sua atividade seja maximizada e cause danos relevantes na organização da membrana. No caso da BbTX-II possívelmente a combinação de aminoácidos aromáticos/hidrofóbicos e positivamente carregados da região C-terminal seja a responsável de alterar a integridade da membrana plasmática. È possível também que microdominios carregados negativamente nas membranas celulares constituam sítios receptores para este grupo de miotoxinas básicas.

A presença destas proteínas no mesmo veneno evidencia a um rol adaptativo relevante ao meio ambiente e permite sugerir que elas procedem de um gene ancestral comum que codifica às variantes catalíticamente ativas, e que, provavelmente, ao longo do processo micro evolutivo, foram sendo expressas algumas modificações nestas proteínas, dando origem à presença de isoformas com o objetivo de garantir a sobrevivência da espécie.





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

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº <u>1505-1</u>, sobre "<u>Miotoxinas PLA<sub>2</sub> e homologas</u> <u>K49 de veneno de Bothrops brazili. Caracterização estrutural e funcional</u>", sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Sergio Marangoni / Salomon Huancahuire</u> <u>Vega</u>, 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 <u>28 de abril de 2008</u>.

### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº <u>1505-1</u>, entitled "<u>Miotoxins PLA<sub>2</sub> and homologues</u> <u>K49 of Bothrops brazili venom. Structural and functional characterization</u>", 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 <u>April 28, 2008</u>.

Campinas, 28 de abril de 2008.

A Mundob 2110

Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo Presidente

SNB Fátima Alonso

Secretária Executiva

CEEA – Unicamp Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/

# 8 BIBLIOGRAFIA

- Andrião-Escarso S.H, Soares A.M, Fontes M.R, Fuly A.L, Corrêa F.M, Rosa J.C, Greene L.J, Giglio J.R. (2002) Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom.*Biochem Pharmacol.*64: 723-32.
- 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, Chavez E, Alape A, Rucavado A, Gutierrez J.M, Lomonte B, (1997) Isolation and caracterization of a miotoxin phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) schlegelii* from Costa Rica. *Arch. Biochem. Biophys.* 339: 260-67.
- Arni R.K, Ward R.J, Cintra A.C, Giglio J.R. (1995) Crystallization and preliminary diffraction data of bothropstoxin I isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon*. 33: 383-86.
- Arni R.K, Ward R.J, (1996) Phospholipase A<sub>2</sub> A strutural review. Toxicon 34: 827-41.
- Azañero M, Escobar E, Yarleque A, (2000) Purificacion de una enzima proteolítica del veneno de *Bothrops brazili* y estúdio de su actividad sobre fibrinogeno. *Rev. Peru. Biol.* 7: 67-75.
- Beghini D.G, Toyama M.H, Hyslop S, Sodek L.C, Novello J.C, Marangoni S.(2000) Enzymatic characterization of a novel phospholipase A<sub>2</sub> from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (maracamboia) venom. *J. Protein Chem.* 19: 679-84.
- Bjarnason J.B, Fox J.W, (1994) Hemorrhagic metalloproteinases from snakes venoms. *Pharmacol Ther*. 62: 325-72.
- Bomalaski J.S, Clark M.A, (1993) Phospholipase A2 and arthritis. Arthritis Rheum.23: 123-43
- 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.
- Bonfim V.L, Ponce-Soto L.A, Novello J.C, Marangoni S. (2006a) 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 Peptide Lett* 13: 707-13.
- Bonfim V.L, Ponce-Soto L.A, Novello J.C, Marangoni S. (2006b) Structural and functional properties of Cr 5, a new Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue isolated from the venom of the snake *Calloselasma rhodostoma*. *Protein J*. 25:492-02.
- Bonfim V.L, Ponce-Soto L.A, Martins de Souza D, Souza G.H, Baldasso P.A, Eberlin M.N, Marangoni S, (2008) Structural and functional characterization of myotoxin, Cr-IV 1, a phospholipase A<sub>2</sub> D49 from the venom of the snake *Calloselasma rhodostoma*. *Biologicals* 36: 168-76.
- Braganca B.M, Sambray Y.M, (1967). Multiple forms of cobra venom phospholipase A. *Nature* 216, 1210–11.
- Breithaupt H (1976) Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A<sub>2</sub> and the crotoxin complex. *Toxicon* 14:221-33
- 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.
- Campbell C.H. (1966) Professor Halford's germ theory of snake poisoning. Med J Aust. 26: 552-55.
- Campbell J, Lamar W, (1989), The venomous reptiles of Latin América. New York, Crustock Publishing Associated, USA.
- Chang C.C; Chen T.F; Lee C.Y. (1973) Studies of the presynaptic effect of bungarotoxin on neuromuscular transmission. *J Pharmacol Exp Ther* 184: 339-45.

- Chaves F, Leon G, Alvarado V.H, Gutiérrez J.M, (1998) Pharmacological modulation of edema induced by Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) *Toxicon* 36: 1861-69.
- Chen Z.X, Zhang H.L, Gu Z.L, Chen B.W, Han R, Reid P.F, Raymond L.N, Qin Z.H. (2006) A long-form alpha neurotoxin from cobra venom produces potent opioid-independent analgesia. *Acta Pharmacol.* 27: 402-08.
- Cho W. Kezdy F.J, (1991) Chromogenic substrates and assay of phospholipases A<sub>2</sub>. *Meth Enzymol*. 197: 75-79.
- 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.
- Cirino G, Peers S.H, Wallace J.L, Flower R.J, (1989). A study of phospholipase A<sub>2</sub> induced oedema in rat paw. *Eur. J. Pharmacol.* 166: 505–10.
- Cogo J.C, Prado-Franceschi J, Cruz-Hofling M.A, Corrado A.P, Rodrigues-Simioni L. (1993) Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. *Toxicon* 31:1237-47.
- Cogo J.C, Prado-Franceschi J, Giglio J.R, Corrado A.P, Cruz-Hofling M.A, Donato J.L, Leite G.B, Rodrigues-Simioni L, (1998), An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A<sub>2</sub> fraction. *Toxicon*; 36: 1323-32.
- Condrea E, Barzilay M, Mager J, (1970). Role of cobra venom direct lytic factor and Calpin promoting the activity of snake venom phospholipase A. *Biochim. Biophys. Acta* 210: 65–73.
- Costa P.D, Toyama M.H, Marangoni S, Rodrigues-Simioni L, da Cruz-Hofling M.A, (1999) Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. *Toxicon* 37: 1143-53.
- Costa T.S, 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, Stábely 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* Article in press. Doi: 10.1016/j.peptides.2008.05.021.
- Curin-Serbec V, Novak D, Babnic J, Turk D, Gubensek F, (1991). Immunological studies of the toxic site in ammodytoxin A. *FEBS Lett.* 280: 175–78.
- Damico D.C.S, Lilla S, de nucci G, Pnce-Soto L.A, Winck F.V, Novello J.C, Marangoni S, (2005) Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp49 phodpholipase A<sub>2</sub> isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom *Biochim Biophys Acta* 1726: 79-86.
- 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 phodpholipase A<sub>2</sub> (LmTX-I) from the venom of the snake *Lachesis muta muta* (bushmaster) *Toxicon* 47: 759-65.
- Dennis E.A. (1994). Diversity of groups types, regulation and function of phospholipase A<sub>2</sub>. J. Biol. Chem. 269: 13057–60.
- Diaz C. Gutierrez J.M, Lomonte B, Gene J.A, (1991) The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A<sub>2</sub>, anticoagulant and myotoxic activities. *Biochim Biophys Acta* 1070: 455-60.
- Diaz-Oreiro C, Gutiérrez J.M, (1997) Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxics phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effect on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon* 35 241-52.
- Dufton M.C, Eaker D, Hider R.C, 1983. Conformational properties of phospholipases A<sub>2</sub>. Secondary-structure prediction, circular dichroism and relative interface hydrophobicity. Eur. J. Biochem. 137, 537–44.

- Escobar E, Rodriguez E, Yarleque A, (1996) Aislamiento y estúdio bioquímico de uma proteasa del veneno de *Bothrops brazili*. Libro Resumenes V *Reunion científica del ICBAR* UNMSM 36:190-8.
- Fan H.W, Cardoso J.L.C, (1995) Clinical Toxicology of snakes bites in South América. In: Meir J, White, editors. *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. Boca Raton: CRC Pres. 667-88.
- Flecther 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.
- Fletcher J.E, Selistre de Araujo H.S, Ownby C.L, (1997) Molecular events in the myotoxic action of phospholipases. In: Kini, R.M, (Ed.), Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function and Mechanism, Wiley, *Chichester, England*. 455–97.
- Fuly A.L, de Miranda A.L, Zingali R.B, Guimarães J.A. (2002) Purification and characterization of a phospholipase A<sub>2</sub> isoenzime isolated from *Lachesis muta* snake venom. *Biochem Pharmacol* 63: 1589-97.
- FUNASA Fundação Nacional de Saúde, (2002), Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. Brasília: FUNASA, *Ministério da Saúde*.
- Geoghegan P, Angulo Y, Cangelosi A, Díaz M, Lomonte B. (1999) Characterization of a basic phospholipase A<sub>2</sub> homologous myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops neuwiedii* (yarará chica) from Argentina.*Toxicon*. 37: 1735-46.
- Ginsborg B.L, Warriner J. (1960) Spontaneous activity in muscle fibres of the chick. *Brit. J. Physiol* 150: 707-17.
- Gutiérrez J.M, Lomonte B, Chavez F.E, Cerdas L, (1986) Pharmacological activities of a toxic phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of snake *Bothrops asper. Comp. Biochem. Physiol.* 84C, 159–64.
- Gutiérrez J.M, Nunez J, Diaz C, Cintra A.C.O, Homsi-Brandeburgo M.I, Giglio J.R, (1991) Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II a phospholipase A<sub>2</sub> isolated from de venom of the snake *Bothrops jararacussu. Exp. Mol. Pathol.* 55: 217-29.
- Gutiérrez J.M, Rojas G, Da Silva Junior N.J, Nunez J. (1992) Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snake) *Toxicon* 30 1299-302
- Gutiérrez J.M. (1995), Clinical Toxicology of snakes bites in Central América. In: Meir J, White, editors. *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. Boca Raton: CRC Pres. 645-65.
- Gutiérrez 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*, pp. 321–52.
- 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(8): 915-31.
- 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* 36: 150.
- 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.

- Halpert J, Eaker D. (1975) Amino acid sequence of a presinaptic neurotoxin from de venom of *Notechis scutatus scutatus* (Australian tiger snake) *J. Biol. Chem.* 250: 6990-97.
- 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.* 37:85-7.
- Harris J.B, Cullen M.J. (1990) Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. *Electron Microsc Rev.*3: 183-211.
- Harris J.B. (1991) Phospholipases in snake venoms and ther effect on the nerve and muscle, In: Snake Toxins, Harvey A.L. (ed), pp 91 129.
- Harvey A.L; Barfaraz A, Thompson E; Faiz A; Preston S. & Harris J.B. (1994) Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. *Toxicon* 32: 257-65.
- Harvey A.L; Bradley K.N; Cochran S.A; Rowan E.G; Pratt J.A; Quillfeldt J.A; Jerusalinsky D.A. (1998) What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon* 36: 1635-40.
- Harvey A.J, Robertson B. (2004) Dendrotoxinas: structure-activity relationships and effects on potassium ion channels. *Curr. Med. Chem.* 11: 3065-72.
- Hati R, Mitra P, Sarker S, Bhattacharyya K.K. (1999) Snake venom hemorrhaginsm Crit. Rev. Toxicol. 29:1-19.
- Heinrikson R.L, Meredith, S.C. (1984). Amino acid analysis by reverse phase high-perfomance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylthiocyanate. *Analytical Biochemistry* 13: p.65-72. Edman, P., Begg, G., (1967). A protein sequenator. *Eur J Biochem*. 1: 80-91.
- Heluany N.F; Homsi-Brandeburgo M.I, Giglio J.R; Prado-Franceschi J, Rodrigues-Simioni L, (1992) Effects induced by Bothropstoxin a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. *Toxicon* 30: 1203-1210.
- 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: 319-328.
- Holzer M, Mackessy S.P. (1996). An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A<sub>2</sub>. *Toxicon* 34: 1149-55.
- Homsi-Brandeburgo M. I; Queiroz L. S; Santo Neto H; Rodrigues-Simioni L; Giglio J.R. (1988) Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial Chemical Characterization and Biological Activity of Bothropstoxin. *Toxicon* 26: 615-27.
- Houmard J, Drapeau G.R. (1972) Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 69: 3506-9.
- Isla M, Málaga O, Yarleque A, (2003) Caracteristicas Bioquímicas y Accion Biológica de una hemorragina del veneno de *Bothrops brazili. Anales da Fac. Méd.* UNMSM 156-66.
- Ivanovski G, Copic A, Krizaj I, Gubensek F, Pungercar J, (2000). The amino acid region 115-119 of ammodytoxins plays an important role in neurotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276: 1229–34.
- 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.
- Kamiguiti A.S, Slupsky J.R, Zuzel M, Hay C.R, (1994) Properties of fibrinogen cleaved by Jararhagin, a metallopreinase from the venom of *Bothrops jararaca*. *Throm Haemost*. 72: 244-9.

- Kanashiro M.M, Escocard R.C.M, Petretski J.H, Prates M.V, Alves e.W, Machado O.L.T, Diaz da Silva W, Kipnis T.L, (2002) Biochemical and biological properties of phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops atrox* snake venom *Biochem.Pharmacol* 64:1179-86.
- Karlsson E. (1979) Chemistry of protein toxic in snake venom. In Lee, C.Y. (Ed): Handbook of *Experimental Pharmacology*, pp 159-212.
- Khan M.A, (2002). Snake venom PLA<sub>2</sub>: bioinformatics approach. Honours thesis, National University of Singapore, Singapore.
- Kini R.M, Iwanaga S, (1986) Structure function relationships of phospholipases II: charge density distribution and themyotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* 24: 895-905.
- Kini R.M, Evans H.J, (1987) Structure-Function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipase A<sub>2</sub>. J. Biol. Chem. 262: 14402 07.
- 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.
- Kini R.M, Chan Y.M, (1999) Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipases A<sub>2</sub> enzimes. *J. Mol. Evol.* 45 124-32.
- Kini R.M, (1997) Phospholipase A<sub>2</sub>: a complex multifuncional protein puzzle in: R. M. Kini (Ed), Venom Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: Structure, Function and Mechanism, *Wiley, Chichester* pp. 1-28.
- Kini R.M, (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Toxicon* 42, 827-40.
- Kini R.M, (2005a) Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 34:200-4.
- Kini R.M, (2005b) Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A<sub>2</sub> enzymes from snake venoms.*Toxicon*. 45:1147-61.
- Kondo K, Zhang J, Xu K, Kagamiyama H, (1989) Amino acid sequence os a presinaptic neurotoxin, agkistrodotoxin, from the venom of *Agkistrodom halys pallas*. J. Biochem. (Tokyo) 105: 196-203.
- Krizaj I, Turk D, Ritonja A, Gubensek F, (1989). Primary structure of ammodytoxin C further reveals the toxic site of ammodytoxin. *Biochim. Biophys. Acta* 999: 198–202.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-85.
- Lalloo D.G, Trevett A.J, Black J, Mapao J, Saweri A, Naraqi S, Owens D, Kamiguti A.S, Hutton R.A, Theakston R.D, Warrell D.A. (1996) Neurotoxicity, anticoagulant activity and evidence of rhabdomyolysis in patients bitten by death adders (Acanthophis sp.) in southern Papua New Guinea. *QJM*. 89:.25-35.
- Landucci E.C.T, de Castro R.C, Pereira M.F, Cintra A.C.O, Giglio J.R, Marangoni S, Oliveira B, Cirino G, Antunes E, de Nucci G, (1998). Mast cell degranulation induced by two phospholipase A<sub>2</sub> homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur. J. Pharmacol.* 343, 257–63.
- Landucci E.C.T, Toyama M.H, Marangoni S, Benedito O, Giuseppe C, Antunes E, de Nucci G, (2000) Effect of crotapotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon* 38: 199-208.
- Lazo F, Rodríguez E, Yarleque A, (1998) Evaluacion comparativa de dos métodos para determinar la activida de fosfolipasa A en venenos de serpientes *Rev. Peru. Biol.* 5: 98-102.
- Lobo de Araujo A, Donato J, Leite G, Prado-Franceschi J, Fontana M, Bon C, Rodrigues Simioni L. (2002) Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom and a caseinolytic fraction. *Toxicon* 40: 1283-94.

- Lomonte B, Tarkowski A, Hanson L.A, (1993) Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 17: 93-105.
- 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, 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.
- Matsui T, Fujimura Y, Titani K, (2000) Snake venom proteases affecting hemostais and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1477: 146-56.
- Marangoni S, Toyama M.H, Arantes E.C, Giglio J.R, da Silva C.A, Carneiro E.M, Goncalves A.A, Oliveira B (1995) Amino acid sequence of TsTX-V, an alpha-toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K<sup>+</sup> permeability of beta-cells from isolated rat islets of Langerhans. *Biochim Biophys Acta*. 1243: 309-14.
- Mazzi M.V, Marcussi S, Carlos G.B, Stabelic 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*, 44 215–223.
- Mebs D, Ownby C.L, (1990) Myotoxic componentsof snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmacol. Ther.* 48: 223-236.
- 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, Puorto G, Theakston R.D.G, Warrell D.A, (1997). Snake bites by the jararacucu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in Sao Paulo state, Brazil. Q. J. Med. 90: 323–34.
- Mukherjee A.B, Miele L, Pattabiraman N, (1994). Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: regulation and physiological role. *Biochem. Pharmac.* 48: 1-10.
- Muniz E.G, Maria W.S, Estevão-Costa M.I, Buhrnheim P, Olórtegui C.C, (2000) Neutralizing potency of horse antibothropic brazilian antivenom against *Bothrops* snake venoms from the Amazonian rain forest. *Toxicon* 38: 1859–63.
- Nunez C.E, Angulo Y, Lomonte B, (2001). Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. *Toxicon* 39: 1587–94.
- Ogawa T, Oda N, Nakashima K.I, Sasaki H, Hattori M, Sasaki Y, Kihara H, Ohno M, (1992). Unusually high conservation of untranslated sequences of cDNAs for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A<sub>2</sub> isoenzymes. *Proc. Natl Acad.* Sci. USA 89: 8557–61.
- Ownby C.L, (1990). Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: Shier, W.T., Mebs, D. (Eds.), Handbook of Toxinology. Marcel Dekker, New York, pp. 601-54.
- 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.
- Pantigoso C, Escobar E, Yarleque A, (2001) Aislamiento y caracterización de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* hoge, 1953 (ophidia: viperidae) *Rev. Per. Biol.* 8: 35-47.
- Pantigoso C, Escobar E, Yarleque A, (2002) Acción de la miotoxina de *Bothrops brazili* Hoge, 1953 (Ophidia: Viperidae) *Rev. Per. Biol.* 9: 74-83.

- Pereira M.F, Novelho J.C, Landucci E.T, Giglio J.R, Cintra A.C.O, Oliveira B, Marangoni S, (1998) The amino acid sequence of bothropstoxin-II na Asp49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venoms, *J. Protein Chem.* 17: 381-86.
- Petan T, Krizaj I, Gubensek F, Pungercar J, (2002). Phenylalanine-24 in the N-terminal region of ammodytoxins is important for both enzymic activity and presynaptic toxicity. *Biochem. J.* 363: 353–58.
- Ponce-Soto L.A, Toyama M.H, Hyslop S, Novello J.C, Marangoni S. (2002) Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA<sub>2</sub> from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *J Protein Chem*; 21:131-6.
- Ponce-Soto L.A. Bonfim V.L, Rodrigues-Simioni L, Novello J.C, and 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 preparations, *Protein J*, 25:147-55.
- Ponce-Soto L.A, Baldasso P.A, Romero-Vargas F.F, Winck F.V, Novello J.C, Marangoni S. (2007a) Biochemical, Pharmacological and Structural Characterization of Two PLA<sub>2</sub> Isoforms Cdr-12 and Cdr-13 from *Crotalus durissus ruruima* Snake Venom. *Protein J.* 26: 39-49.
- Ponce-Soto LA, Lomonte B, Gutiérrez JM, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Marangoni S, (2007b) 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, Lomonte B, Rodrigues-Simioni L, Novello J.C, Marangoni S. (2007c) Biological and Structural Characterization of Crotoxin and New Isoform of Crotoxin B PLA<sub>2</sub> F6a from *Crotalus durissus collilineatus* Snake Venom. *Protein J.* 4: 221-30.
- Prado-Franceschi J, Hyslop S, Cogo J.C, Andrade A.L, Assakura M.T, Reichl A.P, Cruz-Hofling M.A, Rodrigues-Simioni L. (1998) Characterization of a myotoxin from the Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* (green snake): effects on striated muscle and the neuromuscular junction. *Toxicon* 36:1407-2.
- Prianti Jr A.C.G, Ribeiro W, Lopes-Martins R.A.B, Lira-Da-Silva R.M, Prado-Franceschi J, Rodrigues-Simioni L, Cruz-Hofling 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.
- Prijatelj P, Copic A, Krizaj I, Gubensek F, Pungercar J, (2000). Charge reversal of ammodytoxin A, a phospholipase A<sub>2</sub>-toxin, does not abolish its neurotoxicity. *Biochem. J.* 352: 251–55.
- Prijatelj P, Krizaj I, Kralj B, Gubensek F, Pungercar J, (2002). The C-terminal region of ammodytoxins is important but not sufficient for neurotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 269: 5759–64.
- Pungercar J, Krizaj I, Liang N.S, Gubensek F, (1999). An aromatic, but not a basic, residue is involved in the toxicity of group-II phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxins. *Biochem. J.* 341: 139–45.
- 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*. Doi 10.1007/s10930-008-9144-1.
- Ritonja A, Gubensek F, (1985) Ammoditoxin a, a highly lethal phospholipase A<sub>2</sub> from *Vipera* ammodytes ammodytes venom. Biochim. Biophys. Acta 828: 306-12.
- 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.
- Rodrigues-Simioni L; Prado-Franceschi J; Cintra A.C.O; Giglio J.R; Jiang M.S; Fletcher J.E. (1995) No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca<sup>2+</sup> stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin. *Toxicon*, 33: 1479-89.

- Rojas E, Quesada L, Arce V, Lomonte B, Rojas G, Gutiérrez J.M. (2005) Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp Snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Peru and Costa Rica: preclinical assessment. *Acta Tropica* 93: 85–95.
- Rosenberg P, (1990) Phospholipases. In: Shier W.T, Mebs D. (Eds), Handbook of Toxinology. *Marcel dekker*, New York, pp 67-227.
- 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
- Schiavo G. Matteoli M. Montecucco C. (2000) Neurotoxins affecting neuroexocytosis, *Physiol. Rev* 80: 717-66.
- 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.
- Shiomi K.A, Kazama A, Shimakura K, Nagashima Y. (1998) Purification and properties of phospholipases A<sub>2</sub> from the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) venom. *Toxicon*. 36:589-99
- Singh B.S, Armugam A, Kini R.M, Jeyaseelan K, (2000). Phospholipase A<sub>2</sub> with platelet aggregation inhibitor activity from *Austrelaps superbus* venom: protein purification and cDNA cloning. *Arch. Biochem. Biophys.* 375: 289–303.
- 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, Guerra-S, Borja-Oliveira C.R, Rodrigues V.M, Rodrigues-Simioni L, Rodrigues V, Fontes M.R, Lomonte B, Gutierrez 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-Escraso S.H, Angulo Y, Lomonte B, Gutierrez J.M, Toyama M.H, Marangoni S, Arni R.K, Giglio J.R, (2000b) Structural and functional characterization of myotoxin I a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from*Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 373: 7–15.
- Soares A.M, Andrião-Escarso S.H, Bortoleto R.K, Rodrigues-Simioni L, Arni R.K, Ward R.J, Gutierrez J.M, Giglio J.R, (2001) 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, Oshima-Franco Y, Vieira C.A, Leite G.B, Fletcher J.E, Jiang M.S, Cintra A.C, Giglio J.R, Rodrigues-Simioni L. (2002) Mn<sup>2+</sup> ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 668-77.
- Solis C, Escobar E, Yarleque A, Gutierrez S, (1999) Purificacion e caracterizacion de la L-amino acido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* "Jergón shushupe" *Rev. Peru. Biol.* 6: 76-87.
- Subburaju S, Kini R.M, (1997). Isolation and purification of superbins I and II from *Austrelaps superbus* (copperhead) snake venom and their anticoagulant and antiplatelet effects. *Toxicon* 35: 1239–50.
- Takasaki C., Yutani F. Kajiyashiki T, (1990). Amino acid sequences of eight phospholipases A<sub>2</sub> from the venom of Australian king brown snake *Pseudechis australis*. *Toxicon* 28: 329–39.
- 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.

- Toyama M.H; Carneiro E.M; Marangoni S; Barbosa R.L; Corso G, Bochero A.C, (2000) Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatics islets, *Biochim. Biophys Acta*. 1474: 56-60.
- Tsai I.H, Ying-Ming W, Lo-Chun A, Tzu-Ping K, Yi-Hsuan C, Yi-Fang C, (2000) Phospholipases A<sub>2</sub> from *Calloselasma rhodostoma* venom glan cloning and sequencing of 10 of the cDNAs, three-dimensional modeling and chemical modification of the major isozime *Eur. J. Biochem* 267: 6684-91.
- Tselin V.I, Hucho F. (2004) Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Lett.* 557: 9–13.
- Tu AT. (1996) Overview of snake venom chemistry. Adv Exp Med Biol. 391:37-62.
- Uetz P(2002) The EMBL reptile database www.embl-heilderbeg.de/uetz/LivingReptiles.html.
- Van den Bosch (1980) H.Intracellular phospholipases A. Biochim Biophys Acta. 604:191-246.
- 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.
- Verheij H.M, Slotboom A.J, de Haas G.H, (1981) Structure and function of phospholipase A<sub>2</sub>. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 91: 91–203.
- 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 an alkaloid, aristalochic acid. *Toxicon* 25: 501–15.
- Vishwanath B.S, Kini R.M, Gowda T.V, (1988). Purification and partial biochemical characterization of an edema inducing phospholipase A<sub>2</sub> from *Vipera russelli* (Russell's viper) snake venom. *Toxicon* 26: 713–20.
- Yarlequé A. (2000) Las serpientes peruanas y sus venenos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima.
- Yang C.C. (1994). Structure-function relationship of phospholipase A<sub>2</sub> from snake venoms. *J.Toxicol*, 13: 125-77.
- Zeballos J; Escobar E, Yarlequé A, (1999) Aislamiento y algunas propiedades de una fosfolipasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili*. *Boletín de la Sociedad Química del Perú*. Vol. LXV (1) 10-20.
- 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.