



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA BaltMTx, UMA MIOTOXINA ISOLADA
DA PEÇONHA DE *Bothrops alternatus***

Aluna: Déborah Fernanda da Cunha Pereira

Orientador: Fábio de Oliveira

Co-Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

UBERLÂNDIA – MG

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA BaltMTx, UMA MIOTOXINA ISOLADA
DA PEÇONHA DE *Bothrops alternatus***

Aluna: Déborah Fernanda da Cunha Pereira

Orientador: Fábio de Oliveira

Co-Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Bioquímica)

UBERLÂNDIA – MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P436c Pereira, Déborah Fernanda da Cunha, 1991-
2015 Caracterização funcional da BaltMTx, uma miotoxina isolada da

peçonha de *Bothrops alternatus* / Déborah Fernanda da Cunha Pereira. -
2015.

100 p. : il.

Orientador: Fábio de Oliveira.

Coorientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Serpente peçonhenta - Peçonha - Teses. 3.
Bothrops - Teses. 4. Análise cromatográfica - Teses. I. Oliveira, Fábio
de. II. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues. III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV.
Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA BaltMTx, UMA MIOTOXINA ISOLADA
DA PEÇONHA DE *Bothrops alternatus***

Aluna: Déborah Fernanda da Cunha Pereira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Fábio de Oliveira

Examinadores: Prof.^a Dr.^a Mirian Machado Mendes (UFG)

Prof.^a Dr.^a Fernanda Maria Santiago (UFU)

Data da defesa: 30/06/15

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

Prof. Dr. Fábio de Oliveira

Dedico este trabalho aos meus amigos e à minha família,
em especial à minha mãe (*in memorian*), que sei que
sempre esteve ao meu lado, me encorajando a enfrentar os
obstáculos e me guiando pelo melhor caminho.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me tornar capaz de realizar este trabalho e iluminar meu caminho.

Ao professor Dr. Fábio de Oliveira, pela sua amizade e por confiar em mim, se dispondo a me orientar sempre com muita dedicação, paciência e sabedoria.

Agradeço ao meu pai Hudson, à minha irmã Ana Laura e à Rosângela por acreditarem em mim e por me apoiaram em todos os momentos.

Ao meu marido Murilo, pelo apoio, paciência e carinho durante todo o tempo de realização deste trabalho.

Aos amigos do LabMoC, Bruna, Mari, Carla, Mayara, Nadia, Alisson, Sâmela, Kelly, Tamires, Thalita e Edigar, que estiveram comigo em todos os momentos, sempre me apoiando, compartilhando experiências, me amparando nos momentos difíceis, e claro, pelas inúmeras conversas e momentos divertidos que passamos juntos.

Às minhas amigas de longa data, pela torcida, disposição em ajudar, conversas, risadas e por entenderem minha distância.

A todos os professores e funcionários da Universidade Federal de Uberlândia que contribuíram para minha formação e, sobretudo para a realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia N-Biofar (INCT-NBiofar), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

Apresentação.....	1
--------------------------	----------

Capítulo I: Fundamentação Teórica

1. Serpentes brasileiras.....	3
2. O gênero <i>Bothrops</i> e a espécie <i>Bothrops alternatus</i>	6
3. Acidentes ofídicos.....	8
4. Peçonhas de serpentes.....	12
5. Fosfolipases A ₂	15
6. Potencial antimicrobiano e antiparasitário de Fosfolipases A ₂ de peçonhas de serpentes.....	19
7. Hemostasia primária e plaquetas.....	21
8. SVPLA ₂ com efeito na agregação plaquetária.....	26
9. SVPLA ₂ e o processo inflamatório.....	27
Referências bibliográficas.....	33

Capítulo II: Functional analysis of BaltMTx, an anti-platelet and antimicrobial myotoxin isolated from *Botrops alternatus* snake venom

Resumo.....	58
Abstract.....	59
1. Introduction.....	60
2. Material and Methods.....	61
2.1. Material.....	61
2.2. Animals.....	61
2.3. Human blood.....	62
2.4. Isolation of BaltMtx.....	62
2.5 Protein analysis.....	63
2.6 Myotoxic activity.....	63
2.7 Platelet aggregation assay.....	64

2.8 Antimicrobial Activity.....	64
2.9 Antiparasitic Activity.....	65
2.10 Cytokines determination.....	65
2.11 Nitric oxide determination.....	66
2.12 Statistical analysis.....	66
3. Results and Discussion.....	66
Figures.....	73
References.....	82

APRESENTAÇÃO

As peçonhas de serpentes compreendem uma complexa mistura de proteínas, componentes orgânicos de baixo peso molecular e componentes inorgânicos. O estudo das características bioquímicas e funcionais de toxinas purificadas de peçonhas ofídicas torna-se importante não somente pelos efeitos resultantes do envenenamento, mas também pela possível utilização dessas toxinas como ferramentas de pesquisa na área médica.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar uma Fosfolipase A₂ da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* quanto aos seus aspectos funcionais. Essa caracterização compreendeu a avaliação da sua atividade miotóxica, a caracterização da atividade antiplaquetária, a avaliação das atividades antibacteriana e antiparasitária, e a avaliação de seus efeitos inflamatórios. Os objetivos foram atingidos e resultaram em um melhor entendimento dos efeitos da miotoxina, que neste trabalho foi chamada de BaltMTx.

Essa dissertação de mestrado foi preparada de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

O capítulo 1 busca fornecer a motivação e contextualização dessas tarefas no âmbito da literatura internacional. As referências utilizadas neste capítulo foram buscadas nos serviços de indexação ‘PubMed’, ‘Science Direct’ e ‘Scielo’. Ele mostra a importância da serpente *Bothrops alternatus* entre as serpentes do Brasil e do mundo, sob os pontos de vista da distribuição e epidemiologia dos acidentes ofídicos, e termina com uma apresentação sobre a importância que os componentes isolados de peçonhas, como as Fosfolipases A₂, possuem em relação aos aspectos farmacêuticos e terapêuticos.

O capítulo 2 apresenta um relatório das tarefas executadas para purificação e caracterização funcional da BaltMTx, no formato e linguagem do artigo científico que será submetido à publicação, de acordo com os padrões exigidos pelo periódico.

Capítulo I

Fundamentação Teórica

1. Serpentes Brasileiras

As serpentes são animais vertebrados pertencentes à classe Reptilia, à ordem Squamata e à subordem Serpentes. Devido à capacidade de adaptação em diversos ambientes, são encontradas em várias regiões do mundo, onde se conhece aproximadamente 3000 espécies, distribuídas em 20 famílias e 465 gêneros (HICKMAN et al., 2004). Segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia (COSTA; BÉRNILS, 2014), no Brasil há 386 espécies, divididas em 70 gêneros e 10 famílias, mas apenas duas famílias são peçonhentas: Elapidae e Viperidae. Juntas elas compreendem cerca de 60 espécies, às quais pertencem a 6 gêneros: *Micrurus* e *Leptomicrurus* (Elapidae), *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Lachesis* e *Crotalus* (Viperidae).

As serpentes possuem como características, morfológicas e fisiológicas, o corpo alongado e coberto por escamas, ausência de membros locomotores, olhos redondos com pupila vertical ou circular e desprovidos de pálpebras móveis. Elas são desprovidas de ouvido externo, possuem duas narinas, uma localizada de cada lado da cabeça e à frente dos olhos, e língua bifida, sendo que é por esta que as informações químicas são transportadas até o órgão de Jacobson, o qual é análogo ao sistema olfativo. Algumas possuem um orifício entre o olho e a narina chamado de fosseta loreal, o qual é um órgão termorreceptor. Os órgãos internos possuem formato alongado e a bexiga é ausente, sendo que a urina é expelida juntamente com as fezes, através da cloaca (FRANCO, 2003).

A diferenciação entre serpentes peçonhentas e não peçonhentas é definida por alguns autores por algumas características anatômicas e dos hábitos das serpentes. As peçonhentas são caracterizadas como tendo a cabeça triangular, bem destacada do corpo e coberta com escamas pequenas; olhos com pupila em fenda vertical; presença de fosseta loreal; cauda curta e que afina abruptamente; presença de escamas ásperas com nervura central; desenhos na pele; hábitos noturnos e atitude de ataque quando ameaçadas. Enquanto que as serpentes não peçonhentas são caracterizadas como apresentando cabeça arredondada, pouco destacada do corpo e coberta com placas grandes diferentes das escamas que recobrem o corpo; ausência de fosseta loreal; cauda longa e que afina gradualmente; escamas lisas sem nervura central;

pele com colorido uniforme; hábitos diurnos e fogem ao se sentirem ameaçadas (CARDOSO; GONÇALVES, 1996; CRUZ, 1997; GOWDAK; MARTINS, 1997; LOPES, 1996; MARQUES; PORTO, 1997; PAULINO, 1995; PAULINO, 1998; SILVA JÚNIOR; SASSON, 1997; SOARES, 1996; SOARES, 1998). Apesar de serem comumente utilizados, esses modos de diferenciação não são adequados à diversidade de serpentes brasileiras, pois no Brasil existem serpentes peçonhentas com a cabeça que se destaca do corpo, porém há serpentes não peçonhentas com essa característica, como algumas serpentes da família Boidae, conhecidos popularmente como jiboia e sucuri. Há também serpentes peçonhentas com a cabeça arredonda como as corais. Diferenças também ocorrem na presença de escamas pequenas ou placas grandes na cabeça, olhos com pupila em fenda vertical ou arredondada, escamas ásperas ou lisas. Em relação à cauda terminar de maneira abrupta ou gradual, esta não é uma característica constante, pois parte da forma da cauda é relacionada aos hábitos e sexo do animal, em razão de lá estar localizado o hemipênis, o qual é uma estrutura dupla de cópula nos machos (SANDRIM; PUORTO e NARDI, 2005). A coloração das serpentes nem sempre pode ser associada à capacidade de inoculação de peçonha, pois os padrões de cores das serpentes brasileiras são variados, sendo que há espécies com dimorfismo sexual, variações genética, ontogenética e intraespecífica, como as corais peçonhentas que apresentam espécies de cor vermelha, mas apresentam espécies de outras cores, como uma espécie da Amazônia que é negra com cintas de pintas brancas (GRANTSU, 1991).

Tendo em vista as dificuldades na distinção dos dois grupos, é recomendável a utilização da fosseta loreal como critério para a diferenciação, desde que seja observável à distância do animal, pois todas as serpentes peçonhentas possuem tal característica. Após a identificação da fosseta loreal, deve-se observar a extremidade da cauda, se for lisa, provavelmente a serpente é do gênero *Bothrops*, se apresentar guizo, é do gênero *Crotalus*, e se possuir pequenas escamas eriçadas, provável que seja do gênero *Lachesis* (Figura 01) (BRASIL, 2001). Todas as serpentes que possuem fosseta loreal possuem importância para a saúde pública, devido ao risco de envenenamento. Tais distinções não se aplicam para as serpentes do gênero *Micrurus*, pois estas não apresentam fosseta loreal e apresentam cauda com

anatomia diferentes das citadas, porém possuem dentes fixos inoculadores de peçonha na posição anterior do maxilar (Figura 02), sendo de importância médica. Todavia, não é recomendável a manipulação da serpente para verificar o dente devido ao perigo que representa (BRASIL, 2001; PUORTO, 1992, 2001).

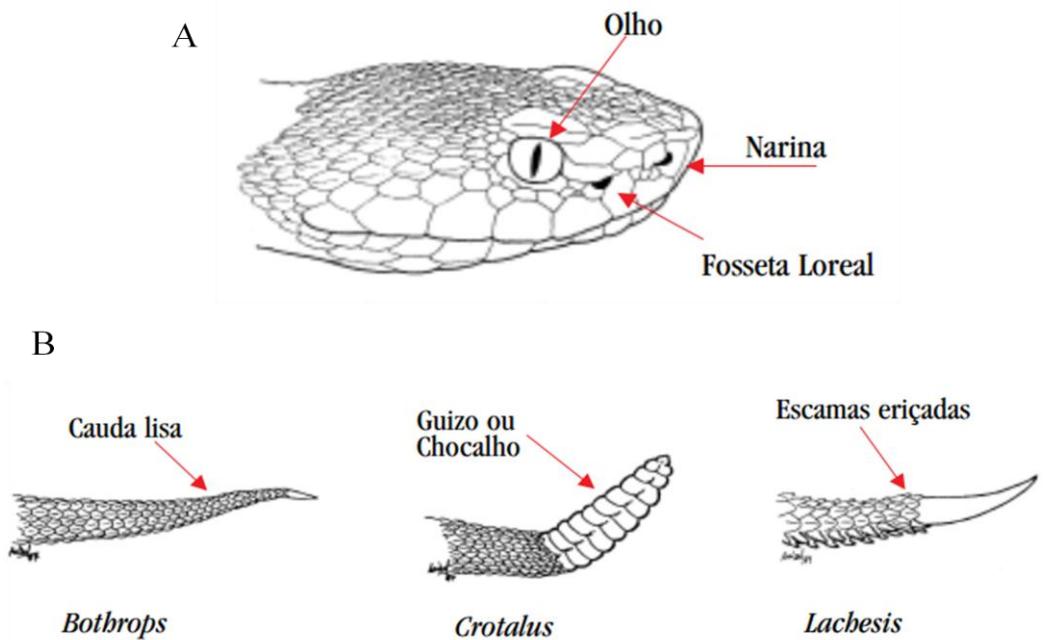


Figura 01: Identificação de serpentes peçonhentas. A - presença de fosseta loreal. B - tipos de caudas. Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2001).

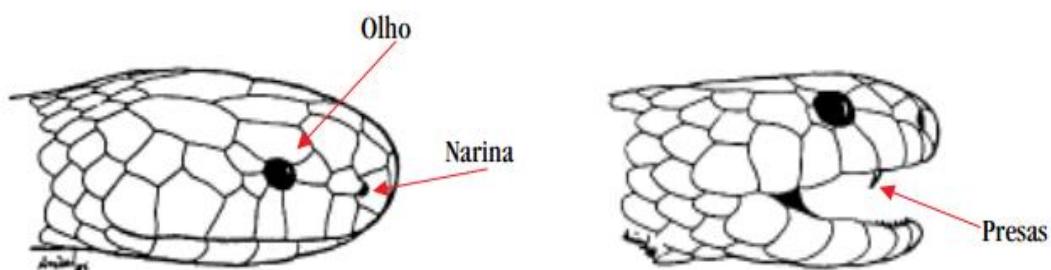


Figura 02: Serpentes do gênero *Micrurus*: não apresentam fosseta loreal e possuem dentes inoculadores de peçonha poucos desenvolvidos e fixos na região anterior da boca. Fonte: (BRASIL, 2001).

As espécies de serpentes peçonhentas possuem um sistema de inoculação da peçonha formado por quatro componentes (Figura 03): glândulas produtoras da peçonha, músculos que forçam a glândula a liberar a peçonha,

ductos que transportam a peçonha, e presas, as quais são dentes modificados que contem canais abertos ou fechados, para inocular a peçonha na vítima. As presas das espécies opistoglifas da antiga família Colubridae, que atualmente teve a maioria de suas subfamílias elevadas à posição de novas famílias (ZAHER et al., 2009), possuem um sulco anterior ou lateral por onde a peçonha escorre, enquanto que as das famílias Elapidae e Viperidae possuem canais fechados, desde a glândula da peçonha até o tecido da vítima. A peçonha é produzida continuamente pelas glândulas e armazenada nas mesmas (ZUG et al., 2000).

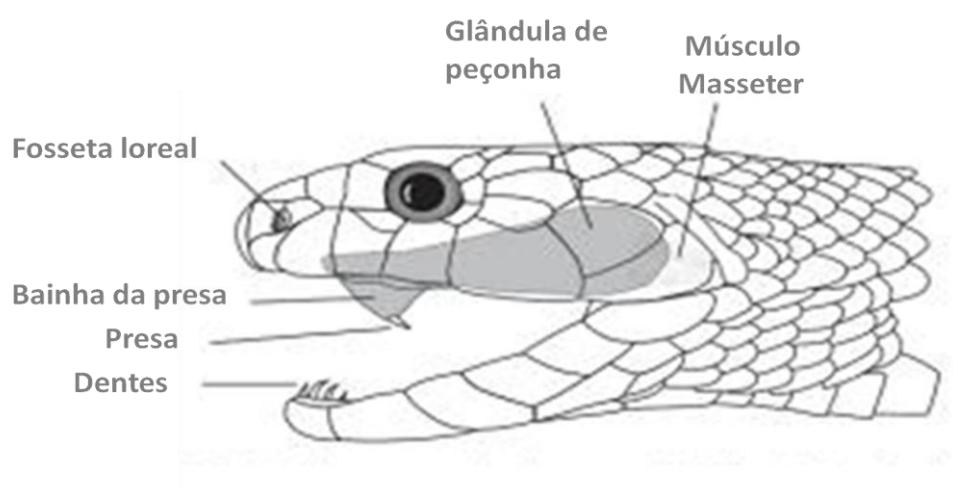


Figura 03: Componentes do sistema de inoculação da peçonha. Fonte: ZUG et al., 2000.

2. O gênero *Bothrops* e a espécie *Bothrops alternatus*

O gênero *Bothrops* (incluindo *Bothrocophias*) representa o grupo mais importante de serpentes peçonhentas brasileiras, com cerca de 30 espécies e subespécies, distribuídas por todo o território nacional (BÉRNILS e COSTA, 2012; BRASIL, 2009). As serpentes deste gênero possuem cauda lisa e suas cores variam muito dependendo da espécie e da região onde vivem (CARDOSO et al., 2003). As espécies mais conhecidas são *B. atrox*, conhecida como Jararaca-do-Norte e encontrada no norte do Brasil; *B. erythromelas*, conhecida como Jararaca-da-seca e encontrada na região nordeste; *B. neuwiedi*, conhecida como Jararaca-pintada e encontrada em todo território nacional, exceto região norte do país; *B. jararaca*, conhecida como Jararaca-

da-mata e distribuída na região sul e sudeste; *B. jararacussu*, conhecida como Jararacussu e encontrada no cerrado da região central e em florestas tropicais do sudeste, *B. moojeni*, conhecida como Caiçaca e encontrada desde o Sul até o Nordeste e *B. alternatus*, conhecida como Urutu-cruzeiro e distribuída no centro-sul do país (PINHO; PEREIRA, 2001). Habitam preferencialmente ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas, zonas rurais e periferias de grandes cidades, e locais onde haja proliferação de roedores. São serpentes de hábitos noturnos ou crepusculares, apresentam comportamento agressivo quando ameaçadas e atacam sem provocar ruídos (BRASIL, 2001).

A espécie *Bothrops alternatus*, descrita por DUMÉRIL, BIBRON e DUMÉRIL (1854), conhecida popularmente como Urutu-cruzeiro, possui o corpo robusto e pode atingir cerca de 1,7 m de comprimento. Possui na pele desenhos em forma de ferradura, dispostos de forma alternada, podendo, eventualmente, haver desenhos opostos (FRANCO, 1986).

É uma serpente de grande importância médica por causar muitos acidentes em humanos. Popularmente, é conhecida por causar graves acidentes, e por isso foi criado o ditado “A urutu quando não mata aleija” (PEREIRA, 1940), porém contrariamente à crença popular, estudos indicam que a peçonha desta serpente possui enzimas com baixa atividade enzimática, se comparada às peçonhas de outras serpentes botrópicas (FURTADO et al., 1991; ROCHA e FURTADO, 2005; SANCHEZ et al., 1992).

Apresentam ampla distribuição geográfica que inclui a região sul (Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina), sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e centro oeste (Mato Grosso) e habitam matas abertas, campos, cerrados e brejos (Figura 04) (SOERENSEN, 2000). Apesar desta ampla distribuição geográfica, a peçonha desta espécie conserva suas características biológicas e enzimáticas em seus exemplares de todo lugar que é encontrado (ROCHA; FURTADO, 2005).

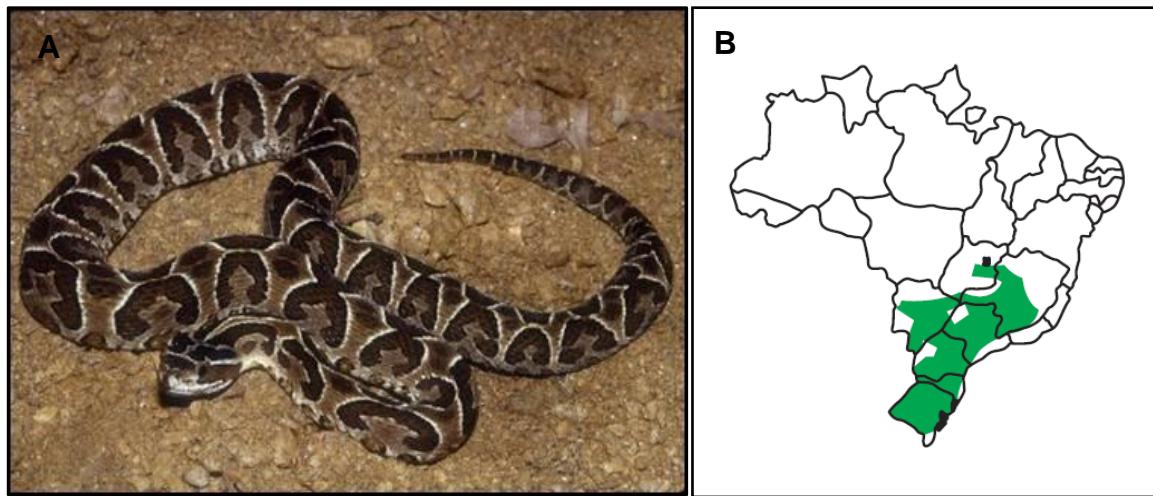


Figura 04: A - Exemplar da espécie *B. alternatus*. Fonte: BORGES-MARTINS et al., 2007.
B - Distribuição geográfica da espécie *B. alternatus* no Brasil. Fonte: (BRASIL, 2001).

3. Acidentes ofídicos

Os acidentes ofídicos representam um sério problema de saúde pública, por ocorrerem frequentemente e por ocasionarem morbi-mortalidade em suas vítimas (PINHO; PEREIRA, 2001). Geralmente, os fatores climáticos e o aumento da atividade de trabalhadores no campo afetam diretamente à ocorrência dos acidentes, pois em épocas quentes e chuvosas, que coincidem com o período de maior atividade no campo, há um aumento do número de casos, sendo estes predominantes em pessoas do sexo masculino, na faixa etária entre 15 e 49 anos, e tem como mais atingidos os membros inferiores (BRASIL, 2001; BOCHNER E STRUCHINER, 2003). Por ser uma condição negligenciada de saúde, os acidentes com serpentes peçonhentas foram incluídos na lista das doenças negligenciadas, em abril de 2009 pela Organização Mundial da Saúde, da qual fazem parte outras 14 enfermidades que afetam comunidades mais pobres e marginalizadas (SOUZA, 2010).

Entre os países sul-americanos, o Brasil é o que apresenta maior número de acidentes por ano (MEBS, 1981). No ano de 2014 foram notificados, pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN, 2014), 151.650 envenenamentos por animais peçonhentos, dentre os quais 21.301 casos foram cometidos por serpentes. A média anual é de cerca de 20.000 acidentes ofídicos por ano (BOCHNER E STRUCHINER, 2003). De acordo com Lira-da-

Silva et al. (2009), este é um valor subestimado, em razão das inadequações na coleta de dados e pelo fato de um grande número de casos não serem notificados.

Dos acidentes ofídicos notificados no país em 2014, 17.406 (81,72%) foram causados por serpentes do gênero *Bothrops*, 1.728 (8,11%) por serpentes do gênero *Crotalus*, 191 (0,89%) por serpentes do gênero *Micrurus*, 748 (3,51%) por serpentes do gênero *Lachesis*, e 1.228 (5,76%) por serpentes não peçonhentas (Figura 05). Isso demonstra a importância epidemiológica do acidente botrópico para o país. Dentre esses acidentes, 104 (0,48%) evoluíram para óbito, sendo que o maior índice de letalidade corresponde ao gênero *Crotalus* com 0,57%, e o menor, ao gênero *Bothrops*, que corresponde a 0,44% (SINAN, 2014).

Nunes et al (2014) analisaram 641 prontuários de vítimas de acidentes ofídicos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, na região do Triângulo Mineiro, de janeiro de 1999 a dezembro de 2013, e observaram que maioria dos acidentes ocorreu nos meses de outubro a abril, no período da tarde. A maior frequência de ocorrência dos acidentes foi atribuída às serpentes do gênero *Bothrops* (54,76%), seguido pelas serpentes do gênero *Crotalus* (30,58%) e do gênero *Micrurus* (1,40%).

Acidentes Ofídicos

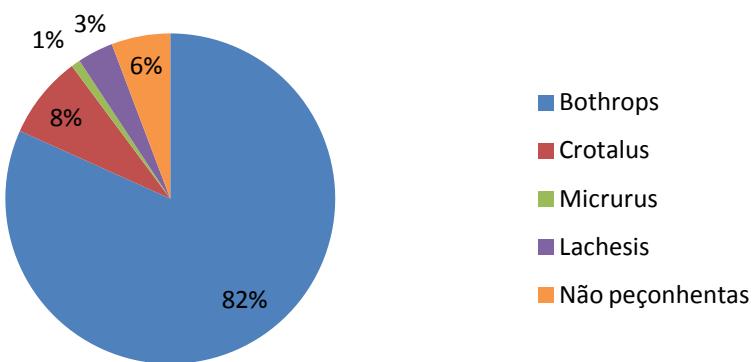


Figura 05: Acidentes ofídicos notificados no Brasil em 2014. Fonte: Adaptado de SINAM, 2014.

Os acidentes botrópicos causam efeitos locais e sistêmicos, sendo que as manifestações locais mais comuns são dor, edema, hemorragia local, formação

de bolhas e necrose tecidual (GUTIÉRREZ et al., 2009, 2011). Os efeitos tem intensidade variável e geralmente ocorre precocemente e possui caráter progressivo (BRASIL, 2001). A dor local é induzida pela liberação de bradicinina e histamina, e a formação do edema ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de proteínas e mediadores inflamatórios (GUTIÉRREZ et al., 2009a).

As manifestações sistêmicas mais comuns são distúrbios na coagulação sanguínea, hemorragia sistêmica, alterações cardiovasculares, náuseas, vômitos, sudorese, hipotensão arterial, hematúria, epistaxes e hematêmese (GUTIÉRREZ et al., 2009b; PINHO; PEREIRA, 2001; WARREL, 2004). A hemorragia sistêmica resulta da ação de frações da peçonha com atividade semelhante à da trombina, as quais formam fibrina devido à degradação de fibrinogênio, induzindo frequentemente a incoagulabilidade sanguínea (BARRAVIERA, 1993; GUTIÉRREZ et al., 2009b; HERRERA et al., 2012; OTERO-PATIÑO, 2009).

A quantidade de peçonha inoculada varia de acordo com o tamanho da serpente e, também, se ela atacou alguma outra presa recentemente (FILHO, 1997). Nos acidentes botrópicos, há uma diferença entre a peçonha do filhote, que é predominantemente coagulante, e do adulto, que possui maior ação proteolítica e menor ação coagulante (JORGE e RIBEIRO, 1990)

Os acidentes botrópicos são classificados em três tipos, de acordo com as manifestações clínicas que apresentam. A forma mais comum do envenenamento é a leve, que é caracterizada por dor e edema local pouco intenso e hemorragias discretas ou ausentes. Já se a dor e o edema forem evidentes e ultrapassarem o local da picada, podendo ou não ter hemorragia local ou sistêmica, o envenenamento é considerado como moderado. O envenenamento é considerado grave se o local da picada apresentar edema intenso, atingindo todo o membro picado, geralmente acompanhado de dor intensa e eventualmente com presença de bolhas. Neste tipo também pode haver sinais de isquemia local devido à compressão dos feixes vásculo-nervosos. Quando ocorrem manifestações sistêmicas como hipotensão arterial, choque, hemorragias intensas, o quadro é considerado grave, independentemente do quadro local (BRASIL, 2001).

Algumas complicações locais e sistêmicas podem ocorrer quando o envenenamento é grave. Como complicações locais, tem-se a Síndrome Compartimental, que ocorre em consequência do grande edema formado, onde há compressão do feixe vaso-nervoso produzindo isquemia nas extremidades, o que resulta em dor intensa, parestesia, cianose e déficit motor, mas essa complicação ocorre raramente. Outra complicação local é o abscesso, que ocorre devido à contaminação pela flora bacteriana oral da serpente, da contaminação pela pele do acidentado, do uso de contaminantes sobre o ferimento e também devido à liberação de mediadores inflamatórios endógenos, e ocorre entre 10 a 20% dos acidentes. A necrose é outro tipo de complicação local, é provocada pela ação proteolítica da peçonha associada à lesão vascular, e pode ser agravada com o uso incorreto de torniquete e demora no tratamento, o que pode resultar em perda irreversível do tecido, havendo possibilidade de amputação do membro afetado (BARRAVIERA, 1993; BRASIL, 2001; CARDOSO et al., 2003; PINHO et al., 2008; STÁBELI et al., 2006).

As complicações sistêmicas são o choque, que é raro e pode ocorrer devido a vários fatores, como liberação de substâncias vasoativas, sequestro de líquido na área do edema e perdas por hemorragias; e a Insuficiência Renal Aguda (IRA), que também pode ocorrer por vários fatores, como pela ação direta da peçonha sobre os rins, isquemia renal secundária à deposição de microtombos nos capilares, desidratação ou hipotensão arterial e choque (BRASIL, 2001).

O diagnóstico é feito a partir da observação dos sintomas, e também pode ser feitas confirmações laboratoriais através de antígenos da peçonha botrópica, que podem ser detectados no sangue através da técnica de ELISA. Podem ser realizadas também avaliações laboratoriais para além de diagnosticar, entender a conduta e a evolução clínica, como o teste de tempo de coagulação (TC) e o tempo parcial de tromboplastina (PTT), que geralmente estão aumentados. É possível também a detecção por hemograma, que geralmente encontra-se hemossedimentação elevada nas primeiras horas do acidente, leucocitose com neutrofilia e plaquetopenia de intensidade variável, por exame de urina, onde se pode observar proteinúria, hematúria e leucocitúria, e também por outros exames, como dosagens de eletrólitos, ureia

e creatinina, pois através deles se detectam precocemente distúrbios hidroelectrolíticos e insuficiência renal aguda (BRASIL, 2001; FILHO, 1997).

O tratamento do acidente botrópico consiste na administração, o mais precocemente possível, por via endovenosa do soro antibotrópico e, na falta deste ou quando não se tem certeza se o envenenamento foi por espécies do gênero *Bothrops*, administra-se as associações antibotrópico-crotálico ou antibotrópico-laquético. O soro antiofídico é formado por fragmentos de imunoglobulinas fracionados a partir do plasma de animais que foram sensibilizados previamente com aplicações sucessivas de pequenas doses da peçonha bruta da serpente ou uma mistura de peçonhas de serpentes. Dessa forma, a presença de títulos elevados de anticorpos capazes de neutralizar a toxina, impede o agravamento do envenenamento (BRASIL, 2001; WHO, 2010).

Além da soroterapia, outras medidas devem ser adotadas, como manter o membro picado elevado e estendido, utilizar analgésicos para aliviar a dor, hidratar o paciente e empregar antibióticos quando houver infecção. Se for diagnosticado o quadro de síndrome de compartimento, deve-se realizar a fasciotomia, desde que as condições de hemostasia permitam, e se necessário realizar a transfusão de sangue (BRASIL, 2001).

A soroterapia tem grandes benefícios, mas ainda possui alguns problemas, pois pode induzir reações de hipersensibilidade e não é capaz de reverter os danos locais provocados pelo envenenamento (DA SILVA et al., 2007; GUTIÉRREZ et al., 2009a). Outro problema no uso de soros antiofídicos é a baixa disponibilidade do mesmo em áreas distantes, o que atrasa a sua administração (CRUZ et al., 2009; GUTIÉRREZ et al., 2009c). E um agravante é que existem variações inter e intraespecífica na composição da peçonha das serpentes da mesma espécie, o que interfere no efeitos patológicos e na neutralização pelo soro (CALVETE et al., 2009).

Sendo assim, o tratamento ideal dos acidentes ofídicos ainda é um desafio da saúde pública, o que torna necessários estudos científicos e incentivos políticos e industriais para o aumento da produção de soros antiofídicos mais eficazes, e assim diminuir os índices de morbi-mortalidade provocados pelos envenenamentos (GUTIÉRREZ et al., 2010).

4. Peçonhas de serpentes

As peçonhas de serpentes são uma mistura heterogênea de substâncias biologicamente ativas produzidas, armazenadas e secretadas por glândulas especializadas. Sua principal função é a captura de alimento, sendo capazes de imobilizar, matar e iniciar a digestão de suas presas. Também são utilizadas para defesa contra agressores (AIRD, 2002; MENEZES et al., 2006). A peçonha interfere rápida e seletivamente em mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares muito específicos, onde atuam direta ou indiretamente, isolados ou em associação, causando uma perturbação no funcionamento dos músculos, nervos e do sistema cardiovascular da presa (DALTRY et al., 1996; MACKESSY et al., 2003; MARKLAND, 1997; SILVA JR.; AIRD, 2001).

Acredita-se que a presença da peçonha em serpentes seja uma adaptação evolutiva convergente (FRY et al., 2006, 2008), sendo que durante o processo evolutivo das serpentes, parte do aparato digestório, principalmente as glândulas salivares e pancreática, tenha se diferenciado num tecido especializado para a produção de peçonha. Durante este processo a saliva e outras secreções gástricas passaram a fornecer as bases para a formação da peçonha (BOISBOUVIER et al., 1998).

As peçonhas das serpentes é a mais complexa dentre as peçonhas do reino animal, devido à riqueza de componentes e propriedades tóxicas que a compõe (DALMORA, 1992). A composição da peçonha é diferenciada entre famílias, gêneros, espécies, subespécies, variações intraespecíficas, e pode ser influenciada pelo habitat e origem geográfica da serpente, sendo que as variações intraespecíficas são decorrentes de variações sazonais, sexuais, dietéticas, de habitat e da idade da serpente (CHIPPAUX et al., 1991). Sua composição se baseia em uma mistura de proteínas com ou sem propriedade enzimática, compostos orgânicos de baixo peso molecular, e compostos inorgânicos (Figura 06) (RAMOS; SELISTRE DE ARAÚJO, 2006).

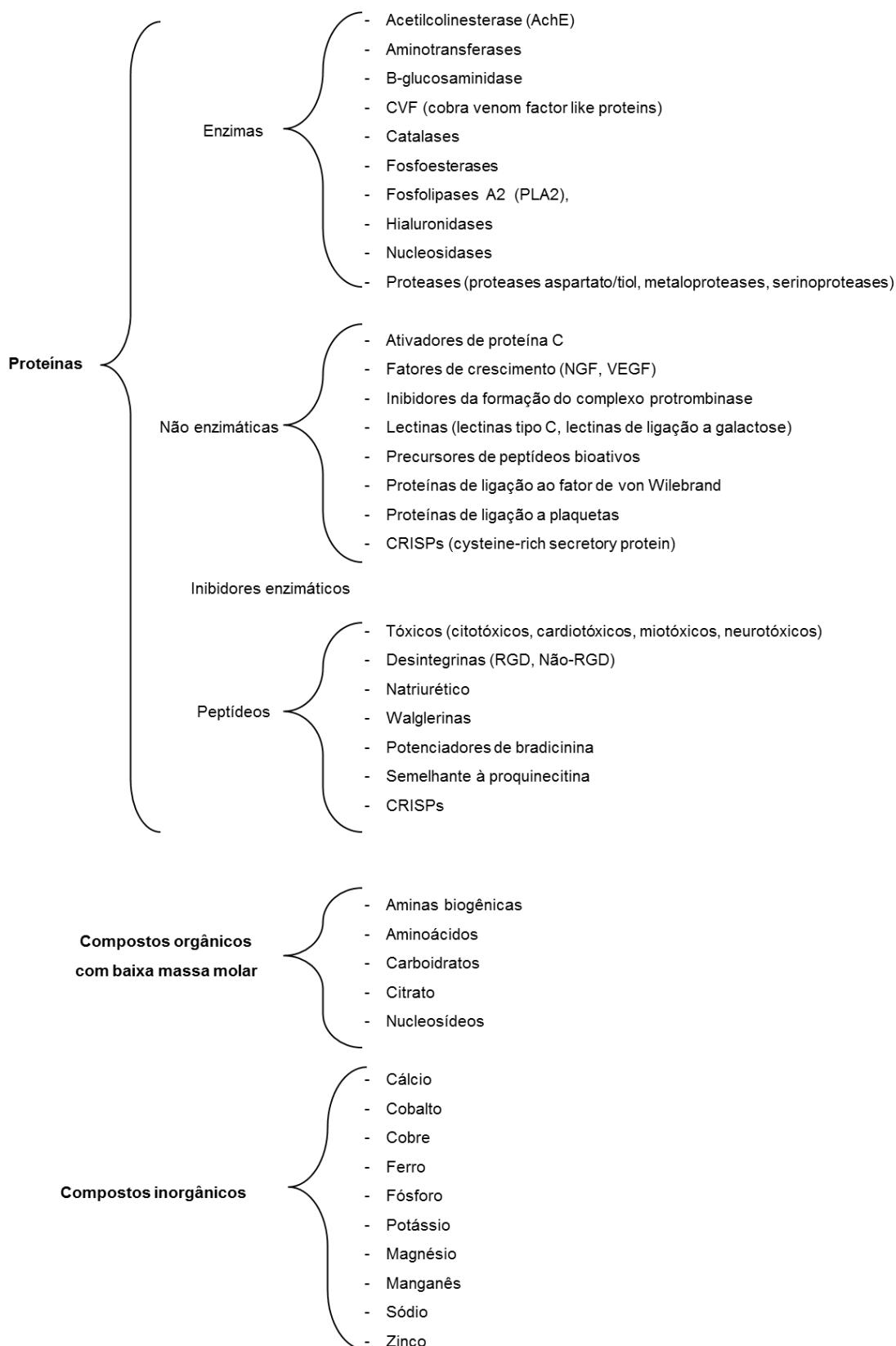


Figura 06: Composição da peçonha de serpentes. Fonte: adaptado de RAMOS; SELISTRE DE ARAÚJO, 2006.

A complexidade das peçonhas é responsável por sua ação na presa, e cada grupo ou combinação de componentes é responsável por seus efeitos. Algumas toxinas, por exemplo, possuem a capacidade de interferir na transmissão em locais pré ou pós-sinápticos causando paralisia, asfixia e morte, sendo consideradas neurotoxinas. Outras, entretanto, são especializadas na rápida necrose das fibras musculares esqueléticas, proporcionando a imobilização das presas e sua pré-digestão, sendo consideradas miotoxinas (IKEDA et al., 2010; LOMONTE et al., 2009; SOARES et al., 2004; TSAI et al., 2001). Muitas das miotoxinas encontradas na peçonha viperírica são proteínas, pertencentes à classe das Fosfolipases A₂.

5. Fosfolipases A₂

As fosfolipases constituem uma superfamília de enzimas (A₁, A₂, B, C e D) capazes de hidrolisar fosfolipídeos, liberando diversos produtos de acordo com o sítio de ação no substrato. As fosfolipases A₁ e A₂ hidrolisam as ligações éster de glicerofosfolípidos intactas nos carbonos C-1 e C-2 do glicerol, respectivamente, e as fosfolipases C e D hidrolisam as ligações fosfodiéster (Figura 07) (LEHNINGER, 2011).

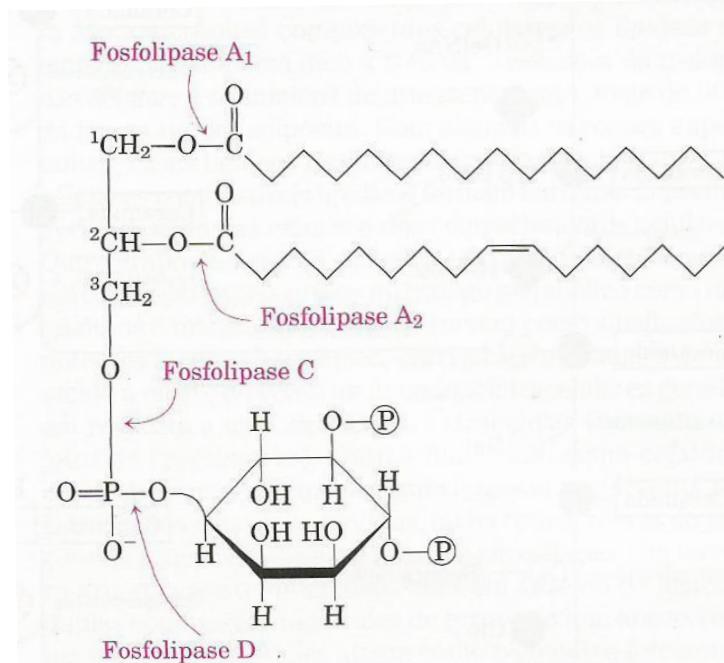


Figura 07: Local de hidrólise das diferentes fosfolipases. Fonte: LEHNINGER, 2011.

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação éster dos fosfolipídeos, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos, (DIAZ; ARM, 2003), assim possuem papel fundamental no metabolismo de lipídeos. Estas enzimas também estão intimamente relacionadas com a liberação de ácido araquidônico (AA), o qual é um precursor de lipídeos bioativos, tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, que podem participar de uma variedade de funções biológicas, como na resposta imune, inflamação e na percepção da dor. Elas também atuam no remodelamento da membrana para a sinalização, no metabolismo, na reprodução e na defesa antimicrobiana (ARNI e WARD, 1996; BALSINDE et al., 1999; DE MARIA et al., 2007; KINI, 2005; LOMONTE; RANGEL, 2012; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As PLA₂s constituem uma superfamília de proteínas classificadas em 16 grupos e vários subgrupos, de acordo com sua origem, sequência de aminoácidos, peso molecular, número de pontes dissulfeto, mecanismos catalíticos e outras características bioquímicas. Elas podem também serem agrupadas em seis tipos distintos de proteínas: as PLA₂ secretadas (sPLA₂), as citosólicas (cPLA₂), as independentes de Ca²⁺ (iPLA₂), as acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH), as lisossomais, e as PLA₂ adiposas (AdPLA) (DENNIS et al., 2011).

As sPLA₂ estão presentes em secreções de vertebrados e invertebrados, e possuem como características a massa molecular variando entre 13 e 19 kDa, contem de 6 a 8 pontes dissulfeto, apresentam um resíduo de Histidina junto ao de Aspartato no sítio ativo e requerem a presença do íon Ca²⁺ para a catálise. Estão classificadas nos grupos IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII, XIV (DENNIS et al., 2011). Estas proteínas representam a maioria em peçonhas de algumas serpentes (VALENTIN et al., 2000). As cPLA₂ são grandes proteínas citosólicas com massa molecular entre 60 e 114 kDa, possuem um resíduo de Serina junto ao de Aspartato no sítio catalítico e estão presentes nos grupos IVA, IVB, IVC, IVD, IVE, IVF. As iPLA₂ possuem massa molecular entre 84 e 90 kDa e também possuem um resíduo de Serina junto ao de Aspartato em seu sítio catalítico, mas não dependem do Ca²⁺ para sua catálise, e estão presentes nos grupos VIA-1, VIA-2, VIB, VIC, VID, VIE e VIF. As PAF-AH possuem massa molecular entre 26 e 45 kDa e apresentam

resíduos de Serina e Histidina junto ao do Aspartato no sítio catalítico. Elas hidrolisam o grupo acetil na posição *sn*-2 de fatores ativadores de plaquetas (PAF), e estão presentes nos grupos VIIA, VIIB, VIIIA e VIIIB. As PLA₂ lisossomais possuem massa molecular aproximadamente a 45 kDa e também possuem resíduos de Serina e Histidina junto ao de Aspartato no sítio catalítico, apresentam uma suposta sequencia sinal N-terminal e sítios de glicosilação N-ligados. Elas apresentam pH ótimo próximo a 4,5, e estão presentes no grupo XV. As AdPLA possuem massa molecular em torno de 18 kDa, possuem resíduos de Histidina e Cisteína no sítio catalítico, são independentes de Ca²⁺ e estão presentes no grupo XVI (DENNIS et al., 2011).

As PLA₂s são encontradas em fluídos e tecidos de mamíferos, e também em peçonhas de abelhas, vespas e serpentes (HARRIS, 1991). As PLA₂s de mamíferos não possuem caráter citotóxico, enquanto que as encontradas nas peçonhas de serpentes são altamente ativas e tóxicas, porém ambas possuem propriedades catalíticas comuns e considerável grau de homologia quanto às estruturas primária, secundária e terciária (DUFTON et al., 1983).

No envenenamento por serpentes, as PLA₂s influenciam direta ou indiretamente em seu efeito fisiopatológico. Além de sua participação na digestão das presas, elas apresentam várias outras atividades como ação hemolítica indireta, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, ação agregadora de plaquetas, atividade anticoagulante, edematogênica, miotóxica e inflamatória (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997; KETELHUT et al., 2003) Nas peçonhas botrópicas, estas proteínas estão relacionadas à mionecrose local, a qual geralmente provoca sequelas drásticas, como perda tecidual, incapacidade ou amputação do membro afetado (ABREU et al., 2007; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; ÂNGULO e LOMONTE, 2009; BARBOSA et al., 2005; CALGAROTTO et al., 2008).

A peçonha das serpentes da família Viperidae possui em sua composição sPLA₂ do grupo II, conhecidas como PLA₂s Asp49. Porém, ao longo da evolução algumas dessas PLA₂s perderam a capacidade de hidrolisar fosfolipídeos, em razão da substituição do resíduo de Aspartato por um resíduo de Lisina na posição 49, juntamente com uma mudança na região ligante de cálcio (PETAN et al., 2007; WARD et al., 2002). As proteínas com essas propriedades são conhecidas como PLA₂ Lys49 homólogas, PLA₂-like ou

miotoxinas Lys49 e possuem baixa ou nenhuma atividade enzimática (LOMONTE; RANGEL, 2012).

As miotoxinas Lys49 geralmente são proteínas básicas, com pontos isoelétricos entre 8 e 10. Possuem aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos em sua estrutura primária, sendo estes estabilizados por sete pontes dissulfetos, altamente conservadas. Comumente, existem na forma de homodímeros, com suas subunidades mantidas por ligações não covalentes, e não foram observadas glicosilação ou outras modificações pós-traducionais em suas estruturas (DELATORRE et al., 2011; LIU et al., 2003; MARCHI-SALVADOR et al., 2009; MURAKAMI et al., 2006).

Apesar de inativas cataliticamente, as PLA₂s Lys49 demonstram toxicidade sobre membranas através de um mecanismo independente de cálcio, porém o mecanismo de ação destas toxinas ainda não é bem elucidado. Estudos com peptídeos sintéticos, com mapeamento dos sítios de interação com moléculas neutralizantes, e mutagênese sítio dirigida tem demonstrado que uma região molecular contendo aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos presentes na região C-terminal das PLA₂s Lys49 é essencial para suas atividades miotóxica, bactericida e sobre lipossomos (AMBROSIO et al., 2005; CHIOATO; WARD, 2003; LOMONTE et al., 2003).

Diversas PLA₂s de peçonhas de serpentes (SVPLA₂s) já foram purificadas e caracterizadas. Tais enzimas apresentam similaridades funcionais e estruturais com PLA₂s de mamíferos. Porém muitas são tóxicas e exibem uma variedade de efeitos farmacológicos por meio de mecanismos que podem ser dependentes ou independentes de sua atividade enzimática, como neurotoxicidade, cardiototoxicidade, miotoxicidade, hemólise, convulsão, anticoagulação, efeito sobre plaquetas, indução de edema e danos em tecidos (KINI, 2003; 2005; SCHALOSKE; DENNIS, 2006; SOARES; GIGLIO, 2003).

Desvendar a estrutura e a função das PLA₂s e suas isoformas é um desafio para os pesquisadores, que tem ampliado o conhecimento sobre o mecanismo de ação destas toxinas, seus efeitos farmacológicos, tóxicos, e agonistas ou antagonistas para algumas doenças importantes (KINI, 2003). Há um considerável número de atividades descritas para estas moléculas como, por exemplo, efeitos antitumorais (RODRIGUES et al., 2009), atividades relacionadas à hemostasia, como atividade anticoagulante, hipotensora e

inibitória sobre a agregação plaquetária (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; DE ALBUQUERQUE MODESTO et al., 2006; ROBERTO et al., 2004; SERRANO et al., 1999) e atividades antiviral e antibacterianas (DENNIS et al., 2011).

6. Potencial antimicrobiano e antiparasitário de Fosfolipases A₂ de peçonhas de serpentes

As bactérias são microrganismos relativamente simples. São procariontes, unicelulares, possuem morfologia e características metabólicas distintas, e são abundantes na natureza. Podem estar associadas às plantas ou animais sem provocar doenças, ou podem agir como patógenas, colonizando tecidos e provocando desordens metabólicas (TORTORA et al., 2005).

Quando as bactérias causam desordens em outros organismos, elas podem ser combatidas por antimicrobianos, os quais são substâncias utilizadas para a destruição ou inibição do crescimento de populações microbianas. Podem ter origem natural, sintética ou semissintética e podem ser classificados com base em sua origem, estrutura química, mecanismo de ação, tipos de microrganismos contra os quais são primariamente ativos, e ação (bacteriostática, bacteriolítica ou bactericida). O antimicrobiano com ação bacteriostática atua na inibição do crescimento, porém sem morte celular através da inibição da síntese proteica por ligação reversível aos ribossomos. A ação bacteriolítica se dá pela inibição da formação da parede celular, e ação bactericida inibe a replicação por ligação irreversível à DNA girase (TRIPATHI, 2006).

A síntese de diversos antimicrobianos contribui para o tratamento de infecções causadas por bactérias, entretanto, ao longo do tempo algumas bactérias se tornaram resistentes aos agentes antimicrobianos. Os padrões de resistência têm sido explicados, principalmente, por modificações de proteínas específicas na constituição da membrana externa, “*outer membrane protein*” (Omp), aperfeiçoamento da bomba de efluxo e produção de enzimas capazes de hidrolisar antibióticos (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; FRÈRE, 1995; POIREL; COLLET; NORDMANN, 2000). Essa resistência gera graves consequências para a saúde pública, o que torna de extrema importância a

investigação e produção de novas substâncias com atividade contra esses microorganismos (GOODMAN; GILMAN'S, 1996).

Vários estudos demonstram o potencial antimicrobiano das peçonhas de serpentes neotropicais. No geral, peçonhas de serpentes das famílias Elapidae e Viperidae são as mais ativas contra bactérias (STILES; SEXTON; WEINSTEIN, 1991), especialmente as do gênero *Bothrops* (PÁRAMO et al., 1998; RODRIGUES et al., 2004; STÁBELI et al., 2004). Já foram descritas várias proteínas de peçonha de serpentes botrópicas com ação antibacteriana, como PLA₂s de *Bothrops asper* (LOMONTE et al., 1999a, 1999b; PÁRAMO et al., 1998; SANTAMARÍA et al., 2005a, 2005b), PLA₂s de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (RODRIGUES et al., 2004; SOARES et al., 2000), PLA₂ de *Bothrops jararacussu* (ROBERTO et al., 2004), PLA₂ de *Bothrops moojeni*, metaloproteases de *Bothrops jararacussu* (MAZZI et al., 2004), L-aminoácido oxidase de *Bothrops alternatus* (STÁBELI et al., 2004) e L-aminoácido oxidase de *Bothrops pirajai* (IZIDORO et al., 2006).

Uma PLA_{2s} Lys49, isolada da peçonha de *B. asper*, e duas de *B. brasili* (MTX-I e II), apresentam atividade antimicrobiana e antifúngica, o que mostra que a atividade bactericida é independente da atividade catalítica, sendo diferente do mecanismo apresentado por fosfolipases antimicrobianas de mamíferos (COSTA et al., 2008; PÁRAMO et al., 1998). Provavelmente, as svPLA₂s agem contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas provocando efeitos perturbadores em suas membranas por um conjunto de aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos encontrados em sua região C-terminal. Esse mecanismo e sua potência são semelhantes ao de peptídeos catiônicos com ação sobre bactérias, como as lactoferrinas e defensinas, encontrados na saliva e em fagócitos humanos, respectivamente, que atuam provocando o deslocamento dos íons Ca²⁺ e Mg²⁺ da superfície celular da bactéria. No entanto, são necessárias doses maiores de SVPLA₂s do que de PLA₂s de mamíferos para a ação antibacteriana. (NEVALAINEN; GRAHAM; SCOTT, 2008; PÁRAMO et al., 1998; SANTAMARÍA et al., 2005b).

Além de suas funções antibacterianas, as SVPLA₂s também exibem atividades antivirais (DENNIS et al., 2011), efeitos antitumorais (RODRIGUES et al., 2009) e produzem algum efeito sobre parasitas (STÁBELI et al., 2006). Algumas SVPLA₂s apresentem atividade citotóxica contra protozoários

causadores da Leishmaniose, como a MjTX – II, uma PLA₂ Lys49 isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*, que é um parasiticida eficaz contra formas promastigotas de espécies do gênero *Leishmania* (STÁBELI et al., 2006). Costa et al. (2008) isolaram uma duas fosfolipases isoladas de *Bothrops brazili*, a MTx – I (PLA₂Asp49) e MTx – II (PLA₂Lys49), que também apresentam efeito citotóxico sobre as *Leishmania* sp. Contrariamente, algumas SVPLA₂s podem estimular o crescimento de formas promastigotas e amastigotas, como uma PLA₂s isolada da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* (PASSERO et al., 2008), ou podem também serem incapazes de inibir o crescimento das *Leishmania* sp., como a BmarPLA₂, isolada de *Bothrops marajoensis* (TORRES et al., 2010).

Como a ação antiparasita das PLA₂s é independente da sua atividade catalítica, visto que tanto PLA₂s Asp49, quanto PLA₂s Lys49 são citotóxicas aos parasitas, acredita-se que a tal atividade está relacionada com a região C-terminal das PLA₂s. Essa região pode conter resíduos de aminoácidos capazes de promover uma perturbação nas membranas celulares, independente da atividade catalítica (LOMONTE et al., 2010). Quanto ao fato de uma PLA₂ estimular o crescimento dos parasitas, acredita-se que provavelmente possa ser pelo fato de as PLA₂s serem fatores de progressão para a leishmaniose cutânea (PASSERO et al., 2008).

7. Hemostasia primária e plaquetas

A hemostasia é o resultado de um conjunto de processos fisiológicos, tanto mecânicos quanto bioquímicos, que executam as importantes funções de manter o sangue em um estado fluido e livre de coágulos nos vasos normais, e em caso de lesão vascular, induzir o tampão hemostático rápido e localizado, e assim evitar hemorragias. É dividida em dois processos que ocorrem simultaneamente e são mecanicamente interligados: a hemostasia primária e a hemostasia secundária ou coagulação sanguínea (COTRAN, 2000; GALE, 2011).

Na hemostasia primária, uma série de mecanismos é desencadeada quando ocorre uma lesão vascular. O primeiro mecanismo é uma vasoconstricção que ocorre em resposta às endotelinas vasoconstritoras,

derivadas das células endoteliais, e resulta na redução do fluxo sanguíneo e da perda de sangue. Posteriormente, as plaquetas circulantes se aderem às proteínas subendoteliais, e há a ativação dessas plaquetas, em processos chamado de adesão e ativação plaquetária. Em seguida há a adesão de outras plaquetas àquelas já aderidas ao sítio da lesão, num processo de agregação plaquetária, e esses mecanismos dão origem ao tampão plaquetário. Na hemostasia secundária, há ativação dos fatores da coagulação, que permite a conversão do fibrinogênio solúvel circulante em fibrina insolúvel, e esta interage com o tampão plaquetário formando um coágulo, ou seja, um tampão hemostático sólido, que impede a continuação da hemorragia (BOZZINI; MOLINAS, 2004; COTRAN, 2000).

As plaquetas exercem um papel central na hemostasia, sendo primordial no processo da hemostasia primária. São células incompletas, pois são fragmentos anucleados derivados da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos da medula óssea. Seu diâmetro varia entre 1 e 4 µm e apresentam meia vida de 8 a 12 dias, sendo eliminadas da circulação por fagocitose mediada por macrófagos (GUYTON; HALL, 2006). Apresentam metabolismo próprio devido à presença de organelas como os grânulos α, grânulos densos, mitocôndrias, lisossomos e peroxissomos, sendo que os grânulos α e densos são fundamentais para as funções hemostáticas. Seu citoesqueleto é composto por um sistema de microtúbulos e microfilamentos que mantém sua forma discoide em estado de repouso e fornecem capacidade contrátil. Esse sistema permite a adesão das plaquetas aos vasos sanguíneos lesados e a agregação com outras plaquetas formando o tampão plaquetário, e permite também a estabilização do tampão pela ação local da trombina (COLLER et al., 2010).

Além de participarem da formação de trombos decorrentes da lesão de vasos sanguíneos, as plaquetas contribuem com seus receptores de membrana que facilitam e amplificam a atividade localizada dos fatores da coagulação sanguínea (RUGGERI; MENDOLICCHIO, 2007). A membrana plaquetária consiste em uma bicamada de fosfolipídeos que atuam em vários estágios da coagulação sanguínea. Na sua superfície existe uma camada de receptores de glicoproteínas (GP) que repelem a aderência das plaquetas ao endotélio normal, entretanto são capazes de serem ativados por diferentes

agonistas e provocar uma mudança conformacional nas plaquetas, e assim favorecer a aderência das plaquetas às áreas lesionadas da parede vascular, principalmente às células endoteliais e ao colágeno exposto, bem como a agregação a outras plaquetas (GUYTON e HALL, 2006; KAMIGUTI, 2005).

Na sua superfície, as plaquetas também apresentam integrinas, as quais são proteínas formadas por duas subunidades, α e β , associadas por ligações não-covalentes. Estas proteínas desempenham papéis importantes na adesão celular, pois conectam a matriz extracelular (MEC) ao citoesqueleto, permitindo assim interações célula-célula ou célula-matriz. As integrinas também permitem a ligação da célula com ligantes extracelulares, como colágeno, laminina e fibronectina, desencadeando vias de sinalização intracelular que regulam a organização do citoesqueleto, polaridade e migração celular, entre outros (SELISTRE-DE-ARAUJO et al., 2010). Existem cinco tipos de subunidades α ($\alpha 2$, αIIb , αV , $\alpha 5$, $\alpha 6$) e dois tipos de subunidades β ($\beta 1$ e $\beta 3$) que formam as integrinas plaquetárias $\alpha IIb\beta 3$ (receptor de fibrinogênio e dominante na superfície das plaquetas), $\alpha V\beta 3$ (receptor de vitronectina), $\alpha 2\beta 1$ (receptor de colágeno), $\alpha 5\beta 1$ (receptor de fibronectina) e $\alpha 6\beta 1$ (receptor de laminina). As integrinas interagem principalmente com a região RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) das moléculas ligantes, podendo interagir também com regiões KGD (lisina-glicina-ácido aspártico), VGD (valina-glicina-ácido aspártico), entre outras (BENNETT et al., 2009; CALVETE et al., 2005; NIESWANDT et al., 2009).

Em condições fisiológicas normais, as plaquetas fluem continuamente dentro dos vasos sanguíneos, sem interagir com a parede vascular. Porém quando há um rompimento da integridade vascular, as plaquetas são submetidas a uma resposta em série, participando da hemostasia primária para prevenir a perda de sangue (HARRISON, 2004). Os processos de adesão e agregação plaquetária são mediados por vários agonistas, ligantes e receptores celulares (Tabela 01) posicionados sobre a superfície das plaquetas ou células endoteliais e proteínas adesivas (LÖWENBERG; MEIJERS; LEVI, 2010).

Tabela 01: Principais agonistas, receptores e ligantes envolvidos na função plaquetária. Fonte: adaptado de JURK e KEHREL, 2005.

Função plaquetária	Agonistas, ligantes	Receptores
	FvW	GPIb/V/IX
	Trombospondina 1	GPIb/V/IX, CD36
	Colágeno	$\alpha_2\beta_1$, GPVI, CD36
Adesão plaquetária	Fibrinogênio	$\alpha_{IIb}\beta_3$
	Fibronectina	$A_5\beta_3$
	Vitronectina	$A_v\beta_3$
	Laminina	$A_6\beta_1$
	Alta tensão de cisalhamento	GPIb/V/IX
Ativação e amplificação	Trombina	PAR1, PAR4, GPIb/V/IX
	ADP	P2Y ₁ , P2Y ₁₂
	TxA ₂	TP α , TP β
	Epinefrina	α_{2A}
	Serotonina	5-HT2A
Agregação/ ampliação e estabilização	Fibrina	$\alpha_{IIb}\beta_3$ ativado
	FvW	$\alpha_{IIb}\beta_3$ ativado, GPIb/V/IX
	Trombospondina 1	$\alpha_{IIb}\beta_3$ ativado, CD36
	Fibronectina	$\alpha_{IIb}\beta_3$ ativado

Os mecanismos realizados pelas plaquetas na hemostasia primária para a formação do coágulo hemostático são a adesão, a ativação e a agregação plaquetária. Na adesão plaquetária, o fator de Von Willebrand (FvW), sintetizado pelas células endoteliais, liga-se ao colágeno presente na porção subendotelial vascular, e interage com o receptor GPIb/V/IX presente na membrana plaquetária. Essa interação induz a secreção de adenosina difosfato (ADP), que aumenta a afinidade da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ pelo FvW e há a formação de ligações firmes e captura de plaquetas (GAWAZ, 2004; JURK; KEHREL, 2005; SIEDECKI et al., 1996). A adesão plaquetária induz uma rápida sinalização celular que provoca a ativação das plaquetas. Esta se dá pelo aumento rápido na concentração de Ca²⁺ provocado pela interação das glicoproteínas da membrana plaquetária com proteínas do subendotélio. Esse Ca²⁺ livre desencadeia uma reorganização das proteínas do citoesqueleto das plaquetas, ativando-as. Então as plaquetas ativadas sofrem uma mudança

conformacional e passam a apresentar-se como esferas irregulares, com emissão de pseudópodes, que facilitam a adesão com a parede dos vasos lesionados. As plaquetas ativadas, também, liberam vários componentes granulares para o meio extracelular, estimulando a circulação de plaquetas adicionais para serem recrutadas a fim de formarem agregados na parede do vaso lesionado (GEORGE, 2000; JURK; KEHREL, 2005; VARGA-SZABO et al., 2009).

As plaquetas possuem grânulos contendo vários agonistas, ligantes, fatores plaquetários e fatores envolvidos na coagulação. O grânulo α contém fibrinogênio, fibronectina, fatores V e VIII, fator plaquetário 4, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator transformante de crescimento α (TGF-α), enquanto que os grânulos densos contêm ATP, ADP, cálcio ionizado, histamina, serotonina e epinefrina (KUMAR et al., 2013). O aumento na concentração de Ca^{2+} é induzido pelos agonistas, com exceção da epinefrina, por meio da liberação de seus estoques internos ou por meio do aumento de influxo de Ca^{2+} do meio extracelular.

O ADP é o principal responsável pela amplificação da ativação das plaquetas, atuando via dois receptores, P2Y₁ e o P2Y₁₂, que ativam a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ para seu estado de mais alta afinidade de ligação e potencializam a secreção plaquetária e reforçam a agregação das plaquetas. As plaquetas aderidas e ativadas formam tromboxano A2 a partir de ácido araquidônico, proveniente dos fosfolipídeos localizados na membrana plasmática, que reforça o processo de ativação plaquetária, após sua ligação a receptores de superfície específicos (TP α e TP β). A epinefrina atua como agente agonista da agregação plaquetária ativando as plaquetas sem provocar mudança conformacional, levando à liberação de ácido araquidônico endógeno (BERNARDI; MOREIRA, 2004).

A ativação das plaquetas promove a formação da trombina por meio da exposição de fosfolipídeos ácidos sobre a superfície externa da plaqueta (RANG et al., 2007). A trombina gerada promove uma maior ativação das plaquetas causando extensa degranulação e ativação dos mecanismos de coagulação, e provoca intensa deposição de fibrina, que reforçará o tampão plaquetário e promoverá sua retração. Além disso, a trombina inativa a

GPIb/V/IX e ativa a GPIIb/IIIa, facilitando a transição da adesão para a agregação plaquetária (COLLER et al., 2010).

A agregação plaquetária é dada pela interação plaqueta-plaqueta e é necessária para que ocorra uma hemostasia efetiva após a adesão inicial de plaquetas ao local da injúria (VARGA-SZABO et al., 2009). O principal receptor envolvido na agregação é a GPIIb/IIIa, pois a interação plaqueta-plaqueta é iniciada pela ligação da integrina $\alpha IIb\beta 3$ ativada ao fibrinogênio e/ou FvW ou ligantes contendo a sequência de aminoácidos RGD ativada, que então gera sinais, resultando na formação de várias camadas de plaquetas, culminando no tampão plaquetário (ISRAELS; RAND, 2013; JURK; KEHREL, 2005). Posteriormente, a superfície das membranas das plaquetas fica rica em fosfolipídeos, e carregada negativamente, e então ativa os fatores de coagulação e a geração de trombina. A trombina é essencial para síntese de fibrina insolúvel a partir do fibrinogênio, formando uma malha que é incorporada em torno do tampão de plaquetas, e essa fortalece e estabiliza o coágulo sanguíneo, durante a hemostasia secundária. (GALE, 2011; LÖWENBERG; MEIJERS; LEVI, 2010).

8. SVPLA₂ com efeito na agregação plaquetária

Um grande número de substâncias que afetam o sistema hemostático está presente nas peçonhas de serpentes, incluindo proteínas anticoagulantes, procoagulantes, fibrino(geno)líticas, moléculas que atuam sobre a parede de vasos sanguíneos, e que interferem na agregação plaquetária (DU et al., 2006; MARKLAND, 1998). Várias proteínas como fosfolipases A₂, desintegrinas, serinoproteases e lectinas do tipo C, modulam seletivamente a adesão ou ativação plaquetária por meio de um efeito específico em receptores e seus ligantes (COELHO et al., 1999; SERRANO et al., 1995; ZINGALI et al., 1993).

Diversas PLA₂s isoladas de peçonhas de serpentes possuem atividade sobre a hemostasia, principalmente as PLA₂s ácidas, que induzem importantes efeitos farmacológicos como ação hemolítica, anticoagulante, e efeitos sobre a hipotensão arterial e sobre a agregação plaquetária (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; DE ALBUQUERQUE MODESTO et al., 2006; ROBERTO et al., 2004; SERRANO et al., 1999). Dependendo do seu efeito sobre plaquetas, as

svPLA₂s podem ser divididas em três grupos: classe A, a qual inclui as PLA₂s capazes de induzir a agregação plaquetária; classe B, PLA₂s que inibem a agregação plaquetária, induzida por vários agonistas fisiológicos; e classe C, PLA₂s que apresentam resposta bifásica sobre plaquetas (KINI; EVANS, 1997).

As PLA₂s interferem na agregação plaquetária por diferentes mecanismos. Elas podem provocar a ativação da agregação plaquetária, pela clivagem dos fosfolipídios presentes nas membranas das plaquetas, liberando ácido araquidônico e formando seus metabólitos, como o tromboxano A₂. Também, podem clivar os subprodutos do ácido araquidônico, inibindo a agregação plaquetária, ou ainda podem atuar por mecanismos independentes de catálise, tendo o efeito mediado por uma mudança no citoesqueleto das plaquetas relacionado a um sítio alostérico (HUANG et al., 1997; KINI; EVANS, 1997). Wang et al (1996) sugerem que os resíduos Phe20 e Trp21, localizados na curta hélice e Phe113 e Trp119, localizados na região C-terminal de PLA₂s participem do processo de inibição da agregação plaquetária.

Já foram descritas algumas PLA₂s que interferem na agregação plaquetária, apresentando efeito inibitório e então pertencentes à classe B, como a BJ-PLA₂ e a BJ-PLA₂-I, que foram isoladas da peçonha de *Bothrops jararaca*, (CEDRO, 2014; SERRANO et al., 1999), a BmooTX-I, isolada de *Bothrops moojeni*, (SANTOS-FILHO et al., 2008), a BE-I-PLA₂, que foi isolada da peçonha de *B. erythromelas* (DE ALBUQUERQUE MODESTO et al., 2006), a BthA-I-PLA₂, isolada de *B. jararacussu* (ROBERTO et al., 2004), a Bpir-I-PLA₂, isolada de *B. pirajai* (TEIXEIRA, 2009); a TJ-PLA₂, isolada de *Trimeresurus jerdoni* (LU et al., 2002), uma PLA₂ isolada de *Crotalus durissus terrificus* (BASTOS, 2007), e uma PLA₂ isolada de *Ophiophagus Hannah* (WANG et al., 1996). Há, também, uma PLA₂ que apresenta efeito ativador da agregação plaquetária, pertencente então à classe B, que foi isolada da serpente *Vipera russellii* por TENG et al. (1984), e uma que possui a capacidade de ativar ou de inibir a agregação plaquetária, dependendo do tempo de incubação, pertencente então à classe C, que foi isolada por FULY et al. (2004) da peçonha de *Bothrops jararacussu*.

9. SVPLA₂ e o processo inflamatório

Os acidentes ofídicos desencadeiam diversas manifestações clínicas relacionadas com as diferentes características das peçonhas de serpentes de diferentes espécies. Nos acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops*, a inflamação e a necrose são as manifestações locais mais evidentes e sua ocorrência se dá em maior parte pela ação de PLA₂s. (TEIXEIRA et al., 2003).

A inflamação ocorre após um tecido ter sofrido alguma injúria, sendo uma resposta protetora do organismo para manter a homeostasia. O processo da inflamação se dá por alterações no calibre vascular, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular. Esses eventos favorecem o extravazamento de proteínas do plasma, a liberação de mediadores químicos, e provoca a migração de leucócitos e sua acumulação no foco da lesão, seguido por fagocitose pelas células competentes. A etapa de reparo da inflamação envolve a diminuição dos agentes pró-inflamatórios, a liberação de mediadores químicos anti-inflamatórios e a remoção de fluidos e detritos celulares pelo sistema linfático (OLIVEIRA et al., 2009; VANE; BOTTING, 1987). Dependendo da sua duração e das células envolvidas, as inflamações podem ser divididas em agudas e crônicas. As inflamações agudas duram desde poucos minutos até poucos dias e provoca a infiltração de neutrófilos na área afetada, e as crônicas persistem por semanas e meses e causam ativação e acúmulo de macrófagos, linfócitos e plasmócitos no local (MONTENEGRO et al., 1999).

A exposição das células inflamatórias à lesão tecidual resulta na produção e na liberação de diversos mediadores químicos, responsáveis pelas características apresentadas pela área inflamada. As principais funções dessas células são induzir os sinais e sintomas da inflamação, aumentando a permeabilidade vascular e provocando dor, vasodilatação e quimiotaxia de células de defesa. Esses mediadores químicos são a histamina, os metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), o fator de agregação plaquetária, a bradicinina, o óxido nítrico, os neuropeptídeos e as citocinas (TEIXEIRA et al., 2003). Eles são liberados por macrófagos, neutrófilos, mastócitos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e plaquetas (VORONOV

et al., 1999). Para esclarecer o que ocorre nos acidentes ofídicos e melhorar a estratégia terapêutica é necessário um melhor entendimento do mecanismo de ação de importantes mediadores inflamatórios.

As cPLA₂s do grupo IV e as sPLA₂s dos grupos II e V são responsáveis pela estimulação da formação do ácido araquidônico (TEIXEIRA et al., 2003). Este pode ser metabolizado por duas classes de enzimas, pelas ciclo-oxigenases COX) e pelas lipoxigenases. A isoforma COX-2 é a envolvida na inflamação, e inicia a biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos. Quando o ácido araquidônico é metabolizado pelas lipoxigenases, há a biossíntese de leucotrienos, os quais podem mediar vários passos da inflamação (BOTTING, 2006).

As prostaglandinas e os tromboxanos possuem ação dilatadora, potencializam os efeitos quimiotáticos e aumentam a permeabilidade vascular para outros mediadores. As prostaglandinas também contribuem para a formação do edema e estão envolvidas nos processos de dor e febre durante uma inflamação (SMITH et al., 2000).

O óxido nítrico (NO) tem sua síntese induzida principalmente por macrófagos e possui ação vasodilatadora, ação regulatória no recrutamento de leucócitos e ação citotóxica contra micro-organismos (SAUTEBIN, 2000). No envenenamento por serpentes, o NO contribui na indução do dano tecidual devido à sua capacidade de gerar peroxinitrito e radicais hidroxila após a interação com íons superóxidos (HOGG, 1992; RADI, 1991), e também na hipotensão, devido à sua ação vasodilatadora (PETRICEVICH et al., 2000).

As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória, favorecendo a reparação do local lesionado. São polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, com massa molecular variando entre 8 e 30 kDa. Podem ser produzidas por diversas células no local da injúria e por células do sistema imunológico por meio da ativação de proteinoquinases ativadas por mitógenos (LIN, 2000). Diferentes tipos de células podem secretar a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, o que é chamado de pleiotropia. Elas também possuem ações semelhantes entre si, e frequentemente são formadas em cascatas, ou seja, uma citocina estimula sua célula-alvo a produzir mais citocinas. As citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevida da célula imunológica,

além de regular a produção e a atividade de outras citocinas, que podem ser pró ou anti-inflamatória, aumentando ou atenuando, respectivamente, a resposta inflamatória (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997).

A produção de citocinas pró e anti-inflamatórias é controlada por um mecanismo de *feedback*. As citocinas pró-inflamatórias são primeiramente responsáveis por iniciar um efeito inflamatório na região da injúria. Entretanto, sua produção excessiva pode gerar efeitos indesejáveis, como o choque, falência múltipla de órgãos, e morte. Em contraste, as citocinas anti-inflamatórias realizam a regulação negativa do processo inflamatório, mantendo a homeostase (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; SOMMER; WHITE, 2010).

Como as citocinas são produzidas por diversas células, não é possível classificá-las quanto à sua origem ou quanto à função biológica, então elas foram agrupadas em vários grupos, como as interleucinas (IL, numerada sequencialmente de IL-1 a IL-35), fatores de necrose tumoral (TNF), quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal (RAEBURN, 2002).

A IL-10 é um exemplo de interleucina anti-inflamatória. Ela é sintetizada em células imunológicas e tecidos neuroendócrinos, e consiste de um polipeptídeo não glicosilado com cerca de 18 kDa. Ela aumenta a proliferação de mastócitos e impede a produção de IFN- γ , e também inibe as citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 e IL-6, estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias, e tem sua produção prejudicada por IL-4, IL-13 e IFN- γ (LIN, 2000; SOMMER; WHITE, 2010; ZHANG, 2007). A IL-12 é um exemplo de interleucina pró-inflamatória, e é secretada por macrófagos e composta de duas subunidades. Ela atua nos receptores específicos de células Natural Killers (NK) e linfócitos T, aumentando a secreção de IFN γ (ECKMANN; KAGNOFF, 2001; GERMANN; RUDE, 1995).

O fator de necrose tumoral α (TNF- α), também é uma citocina pró-inflamatória. É sintetizado por macrófagos, monócitos, neutrófilos e células T. Sua principal função é produzir uma acentuada citólise em diferentes linhagens neoplásicas, mas também provoca alterações endoteliais, como a perda da função de diminuição de coagulação, a atividade quimiotática e estímulo ao

metabolismo oxidativo de fagócitos (MACKAY et al., 1993; TARTAGLIA et al., 1993).

A formação de edema também é uma resposta inflamatória e é uma manifestação local comumente observada em vítimas de envenenamento por serpentes. Alguns estudos relatam a formação ou não de edema em processos inflamatórios induzidos por peçonhas ou PLA₂s isoladas (TEIXEIRA et al., 2003).

A resposta inflamatória desencadeada pelas svPLA₂s podem ser dependentes ou não de atividade catalítica. Sugere-se que essas moléculas apresentem regiões farmacológicas além da região catalítica, e que ambas as regiões desempenhem um papel no processo infamatório (TEIXEIRA et al., 2003). O direcionamento da atividade das PLA₂s depende da molécula alvo, que é uma proteína ou uma glicoproteína na superfície da célula, e uma região complementar específica na PLA₂, o sítio farmacológico, que exibe elevada afinidade para a molécula alvo. A ligação das PLA₂s à molécula alvo, e em alguns casos, a hidrólise subsequente dos fosfolipídios críticos, conduz aos efeitos inflamatórios (KINI; EVANS, 1989).

O importante papel desempenhado pelas SVPLA₂s durante a inflamação foi observado em vários trabalhos, nos quais foram isoladas diversas PLA₂s e seus efeitos inflamatórios foram caracterizados. Há evidências de que a maioria das PLA₂s cause efeitos pró-inflamatórios no local da picada (TEIXEIRA et al., 2003). PLA₂s isoladas da peçonha de *Bothrops jararacussu* (Bothropstoxina-I e Bothropstoxina-II) e de *Bothrops pirajai* (Piratoxina-I) provocaram edema na pata de ratos e infiltrado de mastócitos na cavidade peritoneal (LANDUCCI et al., 1998, 2000). Por outro lado, uma PLA₂ isolada da peçonha de *B. Neuwiedii* induziu edema na ausência de atividade catalítica (DANIELE et al., 1997). A BnSP-7, isolada de *B. pauloensis*, induziu a formação de edema e a liberação de IL-6, IL-8, IL-1-1 β (OLIVEIRA et al., 2009). Uma PLA₂ isolada de peçonha de *B. atrox*, provocou a liberação de IL-6, IL-10 e TNF- α , além de eicosanoides e leucócitos (MOREIRA et al., 2012), a Bleu-TX-III, isolada da peçonha de *Bothrops leucurus*, produziu IL-1, IL-6 e TNF- α (MARANGONI et al., 2013).

Diante deste contexto, nota-se que as peçonhas de serpentes são ricas em compostos farmacologicamente ativos, em especial as PLA₂s, que interferem

no sistema hemostático, apresentando mecanismo capazes de alterar a função plaquetária, e também possuem a capacidade de agir como agentes antibacterianos. Uma investigação detalhada desses componentes presentes em peçonha de serpentes pode fornecer informações para o desenvolvimento de drogas que podem ser aplicadas nos campos terapêuticos da hemostasia, trombose e também dos agentes bactericidas.

Referências Bibliográficas

- ABREU, V. A.; DAL BELO, C. A.; HERNANDES-OLIVEIRA, S. S.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; HYSLOP, S.; FURTADO M. D. E, F.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*). **Comparative Biochemistry Physiology A**, v. 148(1), p. 142-149, 2007.
- AIRD, S. D. Orphidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, v. 40, p. 335-393, 2002.
- AMBROSIO, A. L. B. A.; NONATO, M. C.; DE ARAÚJO, H. S. S.; ARNI, R.; WARD, R. J.; OWNBY, C. L.; SOUZA, D. H. F.; GARRATT.R. C. Molecular mechanism for Lys49-Phospholipase A₂: Activity based on ligand-induced conformational change. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, p. 7326–7335, 2005.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. SOARES, A. M., FONTES, M. R. M., FULY, A. L., CORRÊA, F. M. A, ROSA, J. C., GREENE, L. J., GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 723–732, 2002.
- ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v.54, p.949-957, 2009.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipases A₂: a structural review, **Toxicon**. v. 34, p. 827-841, 1996.
- BALSINDE, J.; BALBOA, M. A.; INSEL, P. A.; DENNIS, E. A. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. Annu. **Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 39, p.175–189, 1999.
- BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; HAVT, A.; TOYAMA, D.O.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; FERREIRA, D. P. P.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; TOYAMA, M. H.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Renal and

antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 376–386, 2005.

BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 65 (4), p. 209 - 250, 1993.

BASTOS, C. M. A. **Ação da peçonha de Crotalus durissus terrificus (SERPENTES: Viperidae) sobre a agregação plaquetária, parâmetros inflamatórios e proliferação celular**. 2007. 67 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Biocoências. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

BENNETT, J. S.; BERGER, B. W.; BILLINGS, P. C. The structure and function of platelet integrins. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.7, p.200-205, 2009.

BERNARDI, P. S.; MOREIRA, H. W. Análise dos traçados de ondas da agregação plaquetária em pacientes com doenças cardiovasculares em uso do ácido acetil salicílico comparados a doadores de sangue. **Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia**, v.26, p.239-244, 2004.

BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. (org.). 2012. Brazilian reptiles – List of species. Vesion 2012.2. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acesso em: 28 fev. 2015.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19(1), p. 07-16, 2003.

BOISBOUVIER, J.; ALBRAND, J. P.; BLACKLEDGE, M.; JAQUINOD, M.; SCHWEITZ, H.; LAZDUNSKI, M.; MARION, D. A structural homologue of colipase in black mamba venom revealed by NMR floating disulphide bridge analysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 283, p. 205-219, 1998.

BORGES-MARTINS, M.; ALVES, M. L. M.; ARAUJO, M. L. de; OLIVEIRA, R. B.; de ANÉS, A. C. Répteis p. 292-315. In: BECKER, F.G.; R.A. RAMOS & L.A. MOURA (orgs.) Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos

Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 2007, 385 p.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). **Journal of Thermal Biology**, v. 31(1–2), p. 208-219, 2006.

BOZZINI, C. E.; MOLINAS, F. Hemostasia. In: HOUSSAY, A. B.; CIRGOLANI, H. E. **Fisiologia Humana de Houssay**. 7^a Ed., Porto Alegre: Artmed, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica: Acidentes por Animais Peçonhentos. **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. 7^a Ed. Brasília: 2009. 816 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. **Fundação Nacional de Saúde**, 2^a Ed., Brasília: 2001. 112 p.

BUSH, K.; JACOBY, G. A; MEDEIROS, A A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995.

CALGAROTTO, A. K.; DAMICO, D. C. S.; PONCE-SOTO, L. A.; BALDASSO, P. A.; DA SILVA, S. L.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, M. N.; MARANGONI, S. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A₂ BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 51, p. 1509-1519, 2008.

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v.45, p.1063-1074, 2005.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v. 583, p. 1736-1743, 2009.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN, H. W.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2^a Edição. São Paulo: Sarvier, 2003.

CARDOSO, A. M. S. C.; GONÇALVES, H. A.; CARDOSO, M. A. B. **Ciências da escola para a vida.** Belo Horizonte: Editora Lê, 1996. p.123-5.

CEDRO, R.C.A. **Isolamento e caracterização funcional de uma fosfolipase A2 de *Bothrops jararaca*: Avaliação do potencial antitumoral e inflamatório.** 2014. 113 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

CHIOATO, L.; WARD, R. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon**; v. 42; p. 869-883, 2003.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v.29, p.1279-1303, 1991.

COELHO, A. L.; FREITAS, M. S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; MOURA-NETO, V.; ZINGALI, R. B.; BARJA-FIDALGO, C. Effects of jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. **Experimental cell research**, v. 251, n. 2, p. 379–387, 1999.

COLLER, B. S. ITALIANO Jr., J. E.; SMYTH, S. S.; WHITEHEART, S. Platelet morphology, biochemistry and function. In: LITCHTMAN, M. A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J. T. **Williams Hematology**. 8^a Edição. The McGraw-Hill Companies, p. 1587 - 1664. 2010.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis Brasileiros: Lista de espécies. Versão 2014. Disponível em <HTTP://www.sbherpetologia.org.br/>. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Acessada em 06 mar. 2015.

COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; OLIVEIRA, C. Z.; SANTOS-FILHO, N. A.; TEIXEIRA, S. S.; NOMIZO, A.; FULY, A. L.; MONTEIRO, M. C.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; STÁBELI, R. G.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1645–1656, 2008.

COTRAN, R. S.; MITCHEL, R. N. Distúrbios hemodinâmicos, trombose e choque. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, C. T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6^a Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CRUZ, L. S.; VARGAS, R.; LOPES, A. A. Snakebite Envenomation and Death in the Developing World. **Ethnicity & Disease**, v. 19, p. 42 - 46, 2009.

CRUZ, D. **Ciências & Educação ambiental – Os seres vivos**. 20. ed. São Paulo: Ática, 1997. p. 60-70.

CURFS, J. H. A. J.; MEIS, J. F. G. M.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A. A primer on cytokines: Sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 742–780, 1997.

DA SILVA, N. M. V.; ARRUDA, E. Z. MURAKAMI, Y. L. B.; MORAES, R. A. M.; EL-KIK, C. Z.; TOMAZ, M. A.; FERNANDES, F. F. A.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; MELO, P. A. Evolution of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venom in mouse model. **Toxicon**, v. 50, p. 196 - 205, 2007.

DALMORA, S. L.; VACCARI, S. F.; SAMPEDRO, A. M.; PEREIRA, J. E. S. Dosagem biológica do antiveneno botrópico. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 54, p. 21-30, 1992.

DALTRY, J. C.; WUSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Nature**. v. 379(6565), p. 537-540, 1996.

DANIELE, J. J.; BIANCO, I. D.; DELGADO, C.; CARRILLO, D. B.; FIDELIO, G. D. A new phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedii* (yararaca chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**, v. 35, p. 1205–1215, 1997.

DE ALBUQUERQUE MODESTO, J. C.; SPENCER, P. J.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R. C.; OLIVA, M. L. V.; DA SILVA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; GUARNIERI, M. C. BE-I-PLA₂, a novel acidic phospholipase A₂ from *Bothrops erythromelas* venom: Isolation, cloning and characterization as potent

anti-platelet and inductor of prostaglandin I₂ release by endothelial cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 3, p. 377–384, 2006.

DE MARIA, L.; VIND, J.; OXENBOLL, K.M.; SVENDSEN, A.; PATKAR, S. Phospholipase and their industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 74, p. 290-300, 2007.

DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; SNATI-GADELHA, T.; TOYAMA, M.H.; CAVADA, B. S. Cristal structural of Bn IV in complex with myristic acid: A Lys49 myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi* venom. **Biochimie**, v. 93, p. 513-518, 2011.

DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y. H.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. Phospholipase A₂ Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. **Chem Rev**, v. 111, n. 10, p. 6130–6185, 2011.

DIAZ, B. L.; ARM, J. P. Phospholipase A₂. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 69, p. 87–97, 2003.

DU, X. Y. SIM, D. S.; LEE, W. H.; ZHANG, Y. Blood cells as targets of snake toxins. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 36, n. 3, p. 414–421, 2006.

DUFTON, M. J.; EAVER, D.; HIDER, R. C. Conformational properties of phospholipases A₂. **European Journal of Biochemistry**. v. 137(3), p. 537-544, 1983.

ECKMANN, L.; KAGNOFF, M. F. Cytokines in host defense against Salmonella. **Microbes Infect**, v.3, n.1, p.1191-1200, 2001.

FILHO, A. A. Acidentes provocados por animais peçonhentos. *In:* Ratton ILA. (ed). **Medicina Intensiva**, 2^a ed. São Paulo, Ed. Atheneu, p. 574-79, 1997.

FRANCO, F. L. **Serpentes da região de Botucatu**. Monografia. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 1986.

FRÈRE, J. M. Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. **Molecular microbiology**, v. 16, n. 3, p. 385–395, 1995.

FRY, B.G.; VIDAL, N.; NORMAN, J.A.; VONK, F.J.; SCHEIB, H.; RAMJAN, R.; KURUPPU, S.; FUNG, K.; HEDGES, S.B.; RICHARDSON, M.K.; HODGSON, W.C.; IGNJATOVIC, V.; SUMMERHAYES, R.; KOCHVA, E. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, v. 439, p. 584–588, 2006.

FRY, B. G.; SCHEIB, H.; VAN DER WEERD, L.; YOUNG, B.; MCNAUGHTAN, J.; RAMJAN, S. F.; VIDAL, N.; PELMANN, R. E.; NORMAN, J. A. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system I the advanced snakes (*Caenophipia*). **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, p. 215- 246, 2008.

FULY, A. L. SOARES, A. M.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; GUIMARÃES, J. A. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A2 isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v. 86, n. 9-10, p. 731–739, 2004.

FURTADO, M. F.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; ANTONIO, L. C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v. 29 (2)p. 219-226, 1991.

GALE, A. Current understanding of hemostasis. **Toxicol Pathol.**, v. 39, n. 1, p. 273–280, 2011.

GAWAZ, M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. **Cardiovascular Research**, v.61, p.498-511, 2004.

GEORGE, J. N. Platelets. **The Lancet**, v. 355, p. 1531 - 1539, 2000.

GERMANN, T.; RUDE, E.; SCHMITT, E. The influence of IL12 on the development of Th11 and Th2 cells and its adjuvant effect for humoral immune responses. **Research in Immunology**, v. 146,p. 481-486, 1995.

GOODMAN H.; GILMAN'S AG. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Ed. McGraw-Hill Companies. USA, 1996. 971 p.

GOWDAK, D.; MARTINS, E. **Natureza & Vida**. São Paulo: FTD, 1997. p.197-208.

GRANTSOU, R. **As cobras venenosas do Brasil**. Tradução Ilse Grantsau. São Bernardo do Campo: Bandeira, 101p. Tradução de Die Gifschlangen Brasiliens, 1991.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 976–987, 2009b.

GUTIÉRREZ, J. M.; FAN, H. W.; SILVERA, C. L. M.; ÂNGULO, Y. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: Report of a workshop. **Toxicon**, v. 53, p. 625 - 630, 2009c.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini, R.M. (Ed.), **Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. John Wiley & Sons, England, 1997, p. 321–352.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F. Venenos de serpientes de la familia Viperidae en América: bioquímica y fisiopatología. In: D'SUZE, G.; CORSO-BURGUETE, G.; PANIAGUA-SOLÍS, J. F. **Emergencias Médicas por Animales Ponzosos en las Américas**. México: 2011, pp. 461-487.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 958 - 975, 2009a.

GUTIÉRREZ, J. M.; WILLIAMS, D.; FAN, H. W.; WARREL, D. A. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, p. 1223–1235, 2010.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Hemostasia e coagulação sanguínea. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, pp. 457 - 470.

Harris, J. B. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. In: H. A. L. (Ed.), **Snake Toxins** (pp. 91-129). Pergamon Press, New York. 1991, 476p.

HARRISON, P. Measuring platelet function? **The Hematology Journal**, v. 5, p. S164 - S169, 2004.

HERRERA, C.; RUCAVADO, A.; WARREL, D. A.; GUTIÉRREZ, J. M. Systemic effects induced by the venom of the snake *Bothrops caribaeus* in a murine model. **Toxicon**, v. 63, p. 19 – 31, 2012.

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. 11^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, cap. 28, pp. 540-541.

HOGG, N.; DARLEY-USMAR, V. M.; WILSON, M.T.; MONCADA, S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide, **Biochem. J.**, v. 281, p. 419-424, 1992.

HUANG, M.Z.; GOPALAKRISHNAKONE, P.F.; KINI, R. M. Role of enzymatic activity in the antiplatelet effects of a phospholipase A2, from *Ophiophagus hannah* snake venom. **Life Sciences**, v. 61, p. 2211-17, 1997.

IKEDA, N.; CHIJIWA, T.; MATSUBARA, K.; ODA-UEDA, N.; HATTORI, S.; MATSUDA, S.; OHNO, M. Unique structural characteristics and evolution of a cluster of venom phospholipase A₂ isozyme genes of *Protobothrops flavoviridis* snake. **Gene**, v. 461, p. 15–25, 2010.

ISRAELS, S. J.; RAND, M. L. What we have learned from inherited platelet disorders. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 60, p. S2 - S7, 2013.

IZIDORO, L. F. M.; RIBEIRO, M. C.; SOUZA, G. R. L.; SANT'ANA, C. D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GOULART, L. R.; BELEBONI, R. O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 20, p. 7034–7043, 2006.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Rev Ass Med Bras**, v. 36, p. 66-77, 1990.

JURK, K.; KEHREL, B. E. Platelets: Physiology and Biochemistry. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v.31, p.381-392, 2005.

KAMIGUTI, A. S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v.45, p.1041-1049, 2005.

KETELHUT, D. F.; DE MELLO, M. H.; VERONESE, E. L.; ESMERALDINO, L. E.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R.; CINTRA, A. C.; SAMPAIO, S. V. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A2 isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v. 85, p. 983–991, 2003.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827 – 840, 2003.

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, p. 1147–1161, 15 jun. 2005.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. **Toxicon**, v. 27, p. 613–635, jan. 1989.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. **Effects of phospholipase A₂ enzymes on platelet aggregation.** In: Kini RM, editor. Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism. England: John Wiley and Sons Ltd. 1997, p. 369–87.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Patologia Básica**, Elsevier Brasil, 9^a edição, 2013. p. 95.

LANDUCCI, E.C.; CASTRO, R.C.; PEREIRA, M.F.; CINTRA, A.C.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **European Journal of Pharmacology**, v. 343, n. 2, p. 257-263,1998.

LANDUCCI, E.C.; TOYAMA, M.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Effect of crotapotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 38, n. 2, p. 199-208, 2000.

LEHNINGER, N.D.; COX, M. **Princípios de Bioquímica**. 5ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, p. 117-126. 2000.

LIRA-DA-SILVA, R.M.; MISE, Y.F.; CASAIS-E-SILVA, L.; ULLOA, J.; HAMDAN, B.; BRAZIL, T.K.. Serpentes de importância médica do Nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v.79, p.7-20, 2009.

LIU, Q.; HUANG, Q.; TENG, M.; WEEKS, C. M.; JELSCH, C.; ZHANG, R.; NIU, L. The crystal structure of a novel, inactive, lysine 49 PLA₂ from *Agkistrodon acutus* venom: an ultrahigh resolution, AB initio structure determination. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 41400-41408, 2003.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, p. 885–901, 2003.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; MORENO, E. Synthetic peptides derived from the C-terminal region of Lys49 phospholipase A₂ homologues from Viperidae snake venoms: biomimetic activities and potential applications. **Curr. Pharm. Design**, v. 16, p. 3220–3224, 2010.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUFINI, S.; CHO, W.; GIGLIO, J.R.; OHNO, M.; DANIELE, J. J.; GEOGHEGAN, P.; GUTIÉRREZ, J. M. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. **Toxicon**, v. 37, n. 1, p. 145–158, 1999b.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SASA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. The phospholipase A₂ homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. **Prot. Pept. Lett.**, v. 16, p. 860–876, 2009.

LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; ANGULO, Y.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Tyr→Trp-substituted peptide 115-129 of a Lys49 phospholipase A2 expresses enhanced membrane-damaging activities and reproduces its in vivo myotoxic effect. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1461, n. 1, p. 19–26, 1999a.

LOMONTE, B.; RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A2 to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, v. 60, p. 520-30, 2012.

LOPES, S. **Bio**. 5.ed. São Paulo: Saraiva, 1996. v. único. 560p.

LÖWENBERG, E. C.; MEIJERS, J. C. M.; LEVI, M. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. **Netherlands Journal of Medicine**, v. 68, n. 6, p. 242–251, 2010.

LU, Q. M.; WEI, Q.; JIN, T.; WEI, J. F.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L. L-amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: Purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. **Journal of Natural Toxins**, v. 11 (4), p. 345-352, 2002.

MACKAY, F.; LOETSCHER, H.; STUEBER, D.; GEHR, G.; LESSLAUER, W. Tumor necrosis factor a (TNF-α)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55 . **J. Exp. Med**, v. 177, p. 1277–1286, 1993.

MACKESSY, S. P.; WILLIAMS, K.; ASHTON, K. G. Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: a case of venom paedomorphosis. **Copeia**, p. 769-782, 2003.

MARANGONI, F. A.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; CRISTINA, E.; LANDUCCI, T. Unmasking Snake Venom of *Bothrops leucurus*: Purification

and Pharmacological and Structural Characterization of New PLA Bleu TX-III. v. 2013, 2013.

MARCHI-SALVADOR, D.P.; FERNANDES, C.A.H.; SILVEIRA, L.B.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystal structure of a phospholipase A₂ homologue complexed with *p*-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. **Biochim.Biophys. Acta**, v. 1794, p. 1583–1590, 2009.

MARKLAND, F. S., Snake venoms. **Drugs**, v. 54 Suppl 3, p. 1-10, 1997.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the Haemostatic System. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749–1800, 1998.

MARQUES, J. L.; PORTO, D. P. **Ciências. Os seres vivos**. 4. ed. São Paulo: Scipione, 1997. p. 62-8.

MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; STABELI, R. G.; FRANCO, J. J.; TICLI, F. K.; CINTRA, A. C. O.; FRANCA, S. C.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: Isolation and biochemical characterization. **Toxicon**, v. 44, n. 2, p. 215–223, 2004.

MEBS, D. **Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms**. WHO Offset Publication No. 58. Geneva: 1981, 44 pp.

MENEZES, M. C.; FURTADO, M. F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v. 47, p. 304-312, 2006.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia Processos Gerais**. 4 ed, 1999. 320 p.

MOREIRA, V.; DOS-SANTOS, M. C.; NASCIMENTO, N. G.; SILVA, H. B.; FERNANDES, C. M.; LIMA, M. R. D.; TEIXEIRA, C. Local inflammatory events

induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon**, v. 60, p. 12–20, 2012.

MURAKAMI, M. T.; MELO, C. C.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; ARNI, R. K. Structure of myotoxin-II, a catalytically inactive Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Atropoides nummifer* venom. **Acta Cryst**, v. 62, p. 423–426, 2006.

NEVALAINEN, T. J.; GRAHAM, G. G.; SCOTT, K. F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂. Review. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1781, n. 1-2, p. 1–9, 2008.

NIESWANDT, B.; VARGA-SZABO, D.; ELVERS, M. Integrins in platelet activation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.7, p.206-209, 2009.

NUNES, D. C. O.; FRANCO, P. S; RODRIGUES, V. M; MENDES, M. M. Clinical-epidemiologic aspects of ophidian accidents occurred in Triângulo Mineiro region, Minas Gerais state, Brazil: retrospective case series. **Biosci. J**, v. 30, n. 6, p. 1942–1951, 2014.

OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; MENDES, M. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; HAMAGUCHI, A.; ALCÂNTARA, T. M.; CLISSA, P. B.; RODRIGUES,V. M. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedi) pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v.53, p.560-569, 2009.

OTERO-PATIÑO, R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. **Toxicon**, v. 54, p. 998 – 1011, 2009.

PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J. A.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom: Synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)- peptide identifies its bactericidal region. **European Journal of Biochemistry**, v. 253, n. 2, p. 452–461, 1998.

PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; TOYAMA, M. H. The effect of phospholipase A₂ from *Crotalus durissus*

collilineatus on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Parasitol. Res.**, v. 102, p. 1025–1033, 2008.

PAULINO, W. R. **Biologia Atual**. 7. ed., São Paulo: Ática, 1995. v. 2, 439p.

PAULINO, W. R. **Biologia**. (volume único). São Paulo: Ática, 1998. 551p.

PEREIRA, N. B. Lesões necróticas determinadas pela Urutu. **Revista de Cirurgia de São Paulo**. v. 5, p. 477-490, 1939-40, 1940.

PETAN, T.; KRIZAJ, I.; PUNGERCAR, J. Restoration of enzymatic activity in a Ser-49 phospholipase A₂ homologue decreases its Ca²⁺-independent membranedamaging activity and increases its toxicity. **Biochemistry**. v. 46, p. 12795-12809, 2007.

PETRICEVICH, V. L.; TEIXEIRA, C. F. P.; TAMBOURGI, D. V.; GUTIÉRREZ, J. M. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 38, p. 1253–1266, 2000.

PINHO, F. M.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Snake bite induced acute kidney injury in Latin America. **Seminars in Nephrology**, v. 28(4), p. 354–362, 2008.

PINHO, F. M.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47(1), p. 24 - 29, 2001.

POIREL, L.; COLLET, L.; NORDMANN, P. Carbapenem-hydrolyzing metallo-B-lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France [2]. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 84–85, 2000.

PUORTO, G. Acidentes por cobras – I. Serpentes brasileiras de importância médica. In: SCHVARTSMAN, S. **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1992. p. 143-9.

PUORTO, G. (ed.). (CD-ROM). **Tudo que você precisa saber**. Museu do Instituto Butantan. São Paulo, 2001.

RADI, R. B. J. S.; BECKMAN, J. S.; BUSH, K. M.; FREEMAN, B. A. Peroxynitriteoxidation of sulphydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 4244–4250, 1991.

RAEBURN, C. D.; SHEPPARD, F.; BARSNESS, K. A. Cytokines for surgeons. **American Journal Surgery**, v. 183, p.268-273, 2002.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 142, p. 328–346, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, J. O.; ASTOLFI-FILHO, S.; NOMIZO, A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M.; SOARES, A. M.; FRANÇA, S. C. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom. **Protein Journal**, v. 23, n. 4, p. 273–285, 2004.

ROCHA, M. T.; FURTADO, M. F. D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bilbron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22 (2), p. 383-393, 2005.

RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R. S.; DE ARAÚJO, A. L.; MALTA-NETO, N. R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 305–314, 2004.

RODRIGUES, R. S.; SILVA, J. F.; BOLDRINI FRANÇA, J.; FONSECA, F. P. P.; OTAVIANO, A. R.; SILVA, F. H.; HAMAGUCHI,A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S. K.; DOS SANTOS, J. I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M. R. M.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Structural and functional

properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**, v. 91, p. 490-501, 2009.

RUGGERI, Z. M.; MENDOLICCHIO, G. L. Adhesion mechanisms in platelet function. **Circulation Research**, v. 100, n. 12, p. 1673–1685, 2007.

SANCHEZ, E. F.; FREITAS, T. V.; FERREIRA-ALVES, D. L.; VELARDE, D. T.; DINIZ, M. R.; CORDEIRO, M. N.; AGOSTINI-COTTA, G.; DINIZ, C. R. Biological activities of venoms from south american snakes. **Toxicon**. v. 30 (1), p. 95-103, 1992.

SANDRIM, M. F. N.; PUORTO, G.; NARDI. R. Venomous snakes accidents: a study about conceptual mistakes in Science and Biology Brazilian textbooks. **Investigações em Ensino de Ciências**, v. 10(3), p. 281-298, 2005.

SANTAMARÍA, C.; LARIOS, S.; ANGULO, Y.; PIZARRO-CERDA, J.; GORVEL, J. P.; MORENO, E.; LOMONTE, B.; Antimicrobial activity of myotoxic phospholipases A2 from crotalid snake venoms and synthetic peptide variants derived from their C-terminal region. **Toxicon**, v. 45, n. 7, p. 807–815, 2005a.

SANTAMARÍA, C.; LARIOS, S.; QUIRÓS, S.; GORVEL, J.; LOMONTE, B.; MORENO, E. Bactericidal and Antiendotoxic Properties of Short Cationic Peptides Derived from a Snake Venom Lys49 Phospholipase A₂. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 4, p. 1340–1345, 2005b.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C. N.; BELETTI, M. E.; DE OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I2 inductor phospholipase A2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 908–917, 2008.

SAUTEBIN, L. Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. **Fitoterapia**, v. 71, p. S48-S57, 2000.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, p. 1246–1259, 2006.

SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; PONTES, C. L. S.; MONTENEGRO, C. F.; MARTIN, A. C. B. M. Review: Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. **Toxins**, v.2, p.2606-2621, 2010.

SERRANO, S. M.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C. A.; FINK, E. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 34(21), p. 7186-7193, 1995.

SERRANO, S. M.; REICHL, A. P.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E. A.; SANTORO, M. L.; SAMPAIO, C. A.; CAMARGO, A. C.; ASSAKURA, M. T. A novel phospholipase A₂, BJ-PLA₂, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 367, n. 1, p. 26–32, 1999.

SIEDIECKI, C. A.; LESTINI, B. J.; KOTTKE-MARCHANT, K. K.; EPPELL, S. J.; WILSON, D. L.; MARCHANT, R. E. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. **Blood**, v. 88 (8), p. 2939 - 2950, 1996.

SILVA JR., N. J.; AIRD, S. D. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 128, p. 425-456, 2001.

SILVA JÚNIOR; C., SASSON, S. **Biologia**. Seres vivos: estrutura e função. 4. ed., São Paulo: Saraiva, 1997. v. 2, p.185-98.

SINAN - Sistema de Informações de Agravos de Notificação. **Acidente por animais peçonhentos**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>>. Acesso em: 31 mar. 2015.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology, **Annual Review of Biochemistry**, Vol. 69: 145-182, 2000.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 378, n. 2, p. 201–209, 2000.

SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R. Chemical modifications of phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 855-868, 2003.

SOARES, A. M.; SESTITO, W. P.; MARCUSSI, S.; STÁBLEI, R. G.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; CUNHA, O. A. B.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. Alkylation of myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, p. 258–270, 2004.

SOARES, J. L. **Biologia 2º Grau**. São Paulo: Scipione, 1996. v. 2, p.178-86.

SOARES, J. L. **Fundamentos de Biologia**. São Paulo: Scipione, 1998. v. 2, 332p.

SOERENSEN, B. **Acidentes por Animais Peçonhentos: Reconhecimento, Clínica e Tratamento**. São Paulo: Atheneu, 2000, 144 p.

SOMMER C, WHITE F - Cytokines, Chemokines, and Pain, In: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. – **Pharmacology of Pain**. 1st Ed, Seattle, IASP Press, 2010, p. 279-302.

SOUZA, W. Doenças negligenciadas. In: Ciência e tecnologia para o desenvolvimento nacional. Estudos estratégicos. **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, 2010, p. 56.

STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M.; SOARES, A. M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 142, n. 3-4, p. 371–381, 2006.

STÁBELI, R. G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; PIETRO, R. C. L. R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; OLIVEIRA, E. B.; SOARES, A. M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 11, p. 2881–2886, 2004.

STÁBELI, R. G.; SANT'ANA, C. D.; RIBEIRO, P. H.; COSTA, T. R.; TICLI, F. K.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A., ALBUQUERQUE, S., MALTA-NETO, N. R.; MARINS, M.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Cytotoxic l-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 2, p. 132–140, 2007.

STILES, B. G.; SEXTON, F. W.; WEINSTEIN, S. A. Antibacterial effects of different snake venoms: Purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**, v. 29, n. 9, p. 1129–1141, 1991.

TARTAGLIA, L. A; GOEDDEL, D. V.; REYNOLDS, C.; FIGARI, I. S.; WEBER, R. F.; FENDLEY, B. M.; PALLADINO JR, M. A. Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75- kDa tumor necrosis factor receptor. **J. Immunol**, v. 151, p. 4637–4641, 1993.

TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v. 54, p. 67-76, 2009.

TEIXEIRA, C. F. P.; LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 947–962, 2003.

TENG, C. M.; CHEN, Y. H.; OUYANG, C. Purification and properties of the main coagulant and anticoagulant principles of *Vipera russelii* snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 786, p. 204–212, 1984.

TORRES, A. F. C.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; FILHO, E. D.; ZARA, F. J.; DE QUEIROZ, M. G. R.; NOGUEIRA, N. A. P.; DE OLIVEIRA, M. R.; TOYAMA, D. O.; MONTEIRO, H. S. A.; MARTINS, A. M. C. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, p. 795-804, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Ed. Artmed. Porto Alegre, RS, 2005, 894 p.

TRIPATHI, K. D. **Farmacologia Médica**. Editora Guanabara Koogan, 5^a Edição, 2006.

TSAI, I. H.; CHEN, Y. H.; WANG, Y. M.; TU, M. C.; TU, A. T. Purification, sequencing, and phylogenetic analyses of novel Lys-49 phospholipases A₂ from the venoms of rattlesnakes and other pit vipers. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 394, n. 2, p. 236-244, 2001.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v.31, p.59-70, 2000.

VANE, J.; BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Faseb j**, 1(2): 89-96, 1987.

VARGA-SZABO, D.; BRAUN, A.; NIESWANDT, B. Calcium signaling in platelet. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, p. 1057 - 1066, 2009.

VORONOV, E.; APTE, R. N.; SOLER, S. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation, **J.Venom. Anim. Toxins**, v. 5, p. 5-33, 1999.

WANG, X.; YANG, J.; GUI, L.; LIN, Z.; CHEN, Y.; ZHOU, Y. 1996. Crystal structure of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys pallas* at 2.0 Å resolution. **J Mol Biol**, v. 255, p. 669-76, 1996.

WARD, R. J.; CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H.; RULLER, R.; AS, J. M. Activesite mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂: biological and membranedisrupting activities in the absece of catalysis. **Biochem. J.**, v. 362, p. 89-69, 2002.

WARREL, D.A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca: 2004, pp. 709–761.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Guidelines for the production control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. Disponível em: <www.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms>. Acesso em: 11 mai 2015.

ZAHER, H.; GRAZZIOTIN, F. G.; CADLE, J. E.; MURPHY, R. W., MOURALEITE, J. C.; BONATTO, S. L.; Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes, Caenophidia) with an emphasis on South American Xenodontines: A revised classification and descriptions of new taxa. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 49(11), p. 115-153, 2009.

ZHANG, L. J.; ZHENG, W. D.; CHEN, Y. X.; HUANG, Y. H.; CHEN, Z. X.; ZHANG, S. J.; SHI, M. N.; WANG, X. Z. Antifibrotic effects of interleukin-10 on experimental hepatic fibrosis. **Hepatogastroenterology**. v. 54(79), p. 2092-8, 2007.

ZINGALI, R. B.; JANDROT-PERRUS, M.; GUILLIN, M. C.; BON, C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: Characterization and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, v. 32, n. 40, p. 10794–10802, 1993.

ZUG, G. R.; VIN, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herptology: an introductory biology of amphibians and reptiles.** New York, Academic Press, 2000.

Capítulo II

Functional analysis of BaltMTx, an anti-platelet and antimicrobial myotoxin isolated from *Borhrops alternatus* snake venom

The paper will be submitted to Toxicon

Functional analysis of BaltMTx, an anti-platelet and antimicrobial myotoxin isolated from *Botrops alternatus* snake venom

Déborah Fernanda da Cunha Pereira¹; Carla Cristine Neves Mamede¹; Bruna Barbosa de Sousa¹; Mariana Santos Matias¹; Nadia Cristina Gomes de Moraes¹; Mayara Ribeiro de Queiroz¹; Sâmela Alves Pereira Batista Vieira¹; Adriano Marcos da Silva³; Mônica Soares Costa¹; Flávia Batista Ferreira²; Vanessa dos Santos Miranda²; Fernanda Maria Santiago²; Fábio de Oliveira¹

¹Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brazil;

²Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brazil;

³Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brazil.

Corresponding author: Tel. (fax): +55-34-3218-2200. E-mail address:
foliveira@umuarama.ufu.br

Resumo

Peçonhas de serpentes são uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos, proteínas e peptídeos, tais como as aminotransferases, acetilcolinesterases, hialuronidases, L-aminoácido-oxidases, fosfolipases A₂, metaloproteases, serinoproteases, lectinas, desintegrinas, entre outros. As fosfolipases A₂ influenciam direta ou indiretamente no efeito fisiopatológico no envenenamento, pois além de sua participação na digestão das presas, elas apresentam várias outras atividades como ação hemolítica indireta, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, ação agregadora de plaquetas, atividades anticoagulante, edematogênica, miotóxica e inflamatória. Neste trabalho, descrevemos a caracterização funcional de BaltMTx, uma PLA₂ de *Bothrops alternatus* que inibe a agregação plaquetária e apresenta efeito bactericida. A purificação de BaltMTx foi realizada por uma combinação de três passos cromatográficos (cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel, seguido de cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-Sepharose, e cromatografia de afinidade em Heparina HiTrap™ HP). A proteína foi purificada até à homogeneidade, tal como avaliado pelo seu perfil de migração em SDS-PAGE, corado com azul de Coomassie, que mostrou uma massa molecular de cerca de 15 kDa sob condições redutoras e cerca de 25 kDa em condições não redutoras. BaltMTx mostrou um efeito inibidor específico sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina em plasma humano rico em plaquetas, de uma maneira dose dependente. Todavia, apresentou pouco ou nenhum efeito sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno e adenosinadifosfato. BaltMTx, também, mostrou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Altas concentrações de BatlMTx estimulou a proliferação de *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Viania) braziliensis*. BaltMTx induziu a produção de mediadores inflamatórios tais como IL-10, IL-12, TNF-α e NO. BaltMTx apresenta grande interesse médico, tanto como uma nova ferramenta para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para a prevenção e tratamento de distúrbios trombóticos, quanto como agente bactericida.

Palavras-chave: Agregação plaquetária; antimicrobiano; *Bothrops alternatus*; miotoxina; peçonhas de serpentes.

Abstract

Snake venoms are a complex mixture of organic and inorganic compounds, proteins and peptides such as aminotransferases, acetylcholinesterase, hyaluronidases, L-amino acid oxidase, phospholipase A₂, metalloproteases, serine proteases, lectins, disintegrins, and others. Phospholipase A₂ directly or indirectly influence the pathophysiological effect on envenomation, as well as their participation in the digestion of the prey. They have several other activities such as hemolytic indirect action, cardiotoxicity, aggregating of platelets, anticoagulant, edema, myotoxic and inflammatory activities. In this work, we describe the functional characterization of BaltMTx, a PLA₂ from *Bothrops alternatus* that inhibits platelet aggregation and present bactericidal effect. The purification of BaltMTx was carried out through three chromatographic steps (ion-exchange on a DEAE-Sephacel column, followed by hydrophobic chromatography on Phenyl-Sepharose and affinity chromatography on HiTrap™ Heparin HP). The protein was purified to homogeneity as judged by its migration profile in SDS-PAGE stained with coomassie blue, and showed a molecular mass of about 15 kDa under reducing conditions and approximately 25 kDa in non-reducing conditions. BaltMTx showed a rather specific inhibitory effect on platelet aggregation induced by epinephrine in human platelet-rich plasma in a dose-dependent manner, whereas it had little or no effect on platelet aggregation induced by collagen or adenosine diphosphate. BaltMTx also showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. High concentrations of BatlMTx stimulated the proliferation of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viania*) *braziliensis*. BaltMTx induced production of inflammatory mediators such as IL-10, IL-12, TNF-α and NO. BaltMTx could be of medical interest as a new tool for the development of novel therapeutic agents for the prevention and treatment of thrombotic disorders as well as bactericidal agent.

Keywords: Antimicrobial; *Bothrops alternatus*; myotoxin; platelet aggregation; snake venom.

1. Introduction

Snake venoms comprise pharmacologically active proteins, enzymatic or non-enzymatic, such as phospholipases A₂ (PLA₂), metalloproteinases, serine proteinases, nucleotidases, L-amino acid oxidase, disintegrins and C-type lectins (Du et al., 2006; Kini; Evans, 1990; Markland, 1998; Sajevic et al., 2011). Several snake venom PLA₂ have been isolated and characterized by their toxic and pharmacological effects, such as myotoxicity, hemolysis, edema, anticoagulation, effects on platelet aggregation, neurotoxicity, cardiotoxicity, hypotension, antitumoral, antiparasitic and antimicrobial activities (Gutiérrez; Lomonte, 1997; Ketelhut et al., 2003; Stábeli et al., 2006; Rodrigues et al., 2007; Sami et al., 2008).

PLA₂ is a class of enzymes that catalyze the hydrolysis of sn-2-acyl bond of sn-3-phospholipids, generating free fatty acids and lysophospholipids as products (van Deenen; de Haas, 1963). They are currently classified in 16 groups on the basis of disulphide bridge patterns, amino acid sequence similarity and catalytic mechanisms (Dennis et al., 2011). PLA₂s are known to belong to groups I (Elapidae/Hydrophidae) and II (Viperidae/Crotalidae). The group II can be subdivided, subsequently, in two main subgroups, depending on the residue at position 49 in the primary structure: Asp49 (D49) are enzymatically active while Lys49 (K49) present low or no enzymatic activity (Lomonte et al., 2003).

Several studies have investigated the effects of PLA₂s in platelet aggregation (Andrião-Escarso et al., 2002; de Albuquerque Modesto et al., 2006; Fuly et al., 2004; Roberto et al., 2004; Santos-Filho et al., 2008; Serrano et al., 1999; Teng et al., 1984).

Some snake venom PLA₂ also exhibit antibacterial and antiparasitic activities, which may be either dependent or independent of catalysis (Costa et al., 2008; Izidoro et al., 2006; Nunes et al., 2013; Páramo et al., 1998; Santamaría et al., 2005b; Stábeli et al., 2006). These activities are based on their general membrane-perturbing effects mediated by a collection of cationic and hydrophobic amino acids in the C-terminal region of the molecule (Nevalainen et al., 2008)

Despite showing significant pharmacological effects, the phospholipase also generate toxic and inflammatory effects. A better understanding of these

effects is also needed to better understand their action in envenomation and to enjoy the best of its beneficial effects. A myotoxin purified from *Bothrops alternans* have been isolated and characterized by (Mamede et al., 2013). In this work, we describe new steps of purification of this PLA₂, which was named BaltMtx, and characterized its effect on platelet aggregation and parasiticidal and antimicrobial activities. In addition, we also assess the inflammatory response induced by this enzyme.

2. Material and Methods

2.1. Material

Desiccated *B. alternatus* venom was purchased from Bioagents Serpentarium (Batatais, SP, Brazil). Acrylamide, ammonium bicarbonate, ammonium persulfate, bromophenol blue, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), glycine, β -mercaptoethanol, *N,N'*-methylene-*bis*-acrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS), *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED) and Tris were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Molecular weight markers for electrophoresis and all chromatographic media (DEAE-Sephacel, Phenyl-Sepharose and HiTrap™ Heparin HP) were purchased from GE Healthcare Technologies (Uppsala, Sweden). All the agonists used in the platelet aggregation assays (collagen from equine tendon, adenosine diphosphate, and epinephrine) were purchased from Helena Laboratories (Beaumont, Texas, USA). All other reagents used were of analytical grade.

2.2. Animals

Swiss and BALB/c mice (20-25 g) were provided from Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA) at the Federal University of Uberlândia (Uberlândia-MG, Brazil). The animals were maintained under conditions of controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), humidity (60-70%) and light/dark cycle (12 hours) with free access to food and water. The experimental protocol was approved by the Committee for Ethics in Animals Experimentation of Federal University of Uberlândia (CEUA/UFU), Minas Gerais, Brazil (Protocol number 108/12).

2.3. Human blood

The experiments were performed in accordance with current guidelines for research with human, established by the Committee for Ethics in Human Research of Federal University of Uberlândia (CEP/UFU), Minas Gerais, Brazil (Protocol number 055/11). Blood was obtained by blood donation from 10 individuals who were invited to participate in the research as volunteer donors. The criteria for the selection of donor volunteers were no signs or symptoms of disease, malnutrition or dehydration, between 18 and 65 years of age, weight more than 50 kg, no use of any medication that interferes with hemostasis, no use of illicit drugs, no alcohol consumption in the last 24 hours preceding the experiment and no hemostasis disorders.

2.4. Isolation of BaltMtx

BaltMtx isolation was carried out according to methods described by Mamede et al (2013), with some modifications. The crude venom of *B. alternatus* (200 mg) was dissolved in 2.0 mL of 0.05M ammonium bicarbonate buffer (pH 7.8) and clarified by centrifugation at 10,000 x g for 10 min. The supernatant was applied to a DEAE-Sephacel column (2.5 x 20 cm) previously equilibrated with 0.05 M ammonium bicarbonate buffer (pH 7.8). Chromatography was carried out at a flow rate of 20 mL/h, with a convex concentration gradient of the same buffer (0.05-0.6 M) and fractions of 3.0 mL/tube were collected. All peaks were monitored by measuring absorbance at 280 nm on a spectrophotometer BioSpec-Mini (Shimadzu Biotech, Japan). The third peak, designated A3, was pooled, lyophilized and applied to a Phenyl-Sepharose column (1,5 x 2,5 cm). The chromatography was carried out at a flow rate of 20 ml/h, with a decreasing gradient of NaCl (4 to 0 M), followed by distilled H₂O and the peaks were monitored by measuring absorbance at 280 nm. The first fraction, designated P1, was pooled, lyophilized and submitted to the third step of separation using a HiTrap™ Heparin HP column (5 x 1 mL) in an ÄKTApurifier™ HPLC system, previously equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 5 mM calcium chloride. The samples were eluted with an increasing concentration gradient of 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 2.0M sodium chloride.

Elution was carried out at a flow rate of 30 mL/h, fractions of 1.0 mL/tube were collected and the absorbance was read at 280 nm.

2.5 Protein analysis

The dosages protein solutions were performed using established method by Bradford (1976). The determination of the concentrations proteins were performed in triplicate and the absorbance measured at 595 nm. The protein concentration (mg/ μ L) was determined from linear regression calculations based on the values obtained from the standard curve. Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) was performed as described by Laemmli (1970) using 14% (w/v) gels. Electrophoresis was carried out at 20 mA/gel in Tris-glycine buffer (pH 8.3) containing 0.01% SDS. The molecular mass standard proteins used were phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and α -lactalbumin (14.4 kDa). Gels were stained with Coomassie blue R-250, 0.2% (w/v).

2.6 Myotoxic activity

BaltMTx and the crude venom (50 μ g) were injected into the right gastrocnemius muscle of mice for evaluation of the myotoxicity by creatine kinase (CK) activity. Control animals received an injection of sterile saline under identical conditions. After 3 hours of the injection, the animals were sacrificed, blood samples were collected from cardiac puncture and centrifuged for plasma separation (Angulo et al., 2000). Creatine kinase (CK) activity was determined using 50 μ L of plasma incubated for 5 min at room temperature with 1.0 ml of the reagent according to the kinetic CK-NAC LiquiUV protocol from InVitro (Brazil). Activity was expressed as U/L, with one unit corresponding to the phosphorylation of 1 nmol of creatine per minute at 25°C.

2.7 Platelet aggregation assay

Platelet aggregation assays were performed in human Platelet-rich plasma (PRP) and measured using the automatic Aggregometer 4 channels (AggRAM™ version 1.1, Helena Laboratories, USA). Human blood collected in sodium citrate was centrifuged at 100 x g for 12 min at room temperature to obtain PRP. Platelet-poor plasma (PPP) was obtained from the residue by centrifugation of citrated blood at 1,000 x g for 15 min. Assays were carried out using 200 µL of PRP maintained at 37°C under continuous stirring in siliconized glass cuvettes. Aggregation was triggered with collagen (10 µg/mL), ADP (20 µM), or epinephrine (300 µM) after pre-incubation of platelets with BaltMTx incubation times (0, 15 and 30 min) at 37°C and different doses of BaltMTx (0,6, 1,2 and 3 µg). One hundred percent (100%) aggregation was expressed as the percentage absorbance relative to PPP aggregation. Control experiments were performed using only platelet agonists.

2.8 Antimicrobial Activity

The antimicrobial activity of BaltMTx was assessed against *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) by the microdilution broth method. Bacteria were grown in Muller Hilton (MH) broth with shaking at 37°C for 18h. The optical density was measured on a spectrophotometer Mini-BioSpec (Shimadzu Biotech, Japan). When the optical density reached 1, the dilution of the bacteria solution was taken. *E. coli* was diluted in MH broth in a ratio of 1:50 and *S. aureus* 1:100. To determine the minimum inhibitory concentration (MIC), 25 µL of the bacterial solution were applied in a 96-well plate with 25 µL of BaltMTx seriously diluted from 65 µg. For the negative control was used autoclaved MilliQ water and the positive control was used gentamicin. The plate was kept at 37°C for 22h and the absorbance were measured in an EL × 800 microplate reader (BioTek Instruments) at 595 nm.

2.9 Antiparasitic Activity

The antiparasitic activity of BaltMTx was assessed against *Leishmania* (*Leishmania infantum* and *Leishmania (Viania) braziliensis*) promastigotes. Viability assays in the presence of toxin were performed on parasites by a colorimetric method based on mitochondrial oxidation of MTT reagent. First, parasites were resuspended in complete LIT's medium (supplemented with fetal bovine serum (FBS), glucose and antibiotics) and placed on 96-well culture plates (5×10^5 parasites/well) and incubated at 23°C with different toxin concentrations (2-fold serial dilution from 100 mg mL⁻¹ of toxin) for 72 h. After incubation, the parasite viability were accessed by adding MTT reagent (5 mg mL⁻¹ in LIT's medium, 100 µg/well) to the plates and incubation proceeded for about 4 h at 37°C protected from light. The reaction was stopped by adding 100 µL of PBS containing 10% SDS and HCl 0,01 M. The absorbances were measured in an EL × 800 microplate reader (BioTek Instruments) at 570 nm. Each assay was carried out in triplicate and independent experiments were performed.

2.10 Cytokines determination

To determine the ability of the crude venom and BaltMTx to stimulate the production of IL-10, IL-12 and TNF-α cytokine, mouse peritoneal macrophages were obtained according to Santana et al. (2014). To assay macrophage stimulation, polystyrene 96-well plates were plated with 2×10^5 cells/well and incubated for 18 hours at 37°C, 5% CO₂. Next, they were added the enzyme at different dilutions of 60, 30, 10, 3, 1, 0.3 and 0.1 mg/mL for 24 hours, in triplicate. Subsequently, at the end of the incubation the plates were centrifuged at 500g for 5 minutes, and supernatants were collected and stored at -70°C until further analysis for cytokines.

2.11 Nitric oxide determination

To assess the production of nitric oxide (NO) by macrophages in culture, initially BALB/c mice were stimulated for 72 hours with 3% thioglycolate intraperitoneally. Following this period, the animals were sacrificed by cervical

dislocation and the peritoneal lavage was performed with 4 mL of incomplete RPMI medium. Next, the obtained material of interest, containing the macrophages, was centrifuged at 500g for 8 minutes. The number of cells was adjusted to 1×10^6 cells per well (96-well plates) and cultured at 37°C in an oven for 18 hours. After cell attachment period, macrophages were treated for 48 hours in the presence or absence of BaltMTx (0.1-60 mg/mL) and control: LPS 1 mg/mL (positive control) or only complete RPMI (negative control). NO production was quantitated by accumulation of nitrite in the supernatant using the Griess assay. For this reaction, 50mL of the supernatants were incubated with Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl ethylenediamine dihydrochloride, 2.5% H₃PO₄) were used in a 1:1:1 for 10 minutes, with the standard curve values of known NaNO₂ diluted in medium RPMI. Finally, the absorbance was measured at 570 nm on a microplate spectrophotometer, and converted to NO in micromolar concentration.

2.12 Statistical analysis

The statistical analyses were carried out by ANOVA, followed by Tukey, using the R 3.1.2 (R Development Core Team 2009), and GraphPad prism program version 5.01. Differences with p-values of less than 5% ($p < 0.05$) were considered statistically significant.

3. Results and Discussion

B. alternatus snake, popularly known as “urutu-cruzeiro”, is distributed in central, southeastern and south Brazil. This snake is of great medical importance because it causes many accidents in humans (Soerensen, 2000). *B. alternatus* venom is a rich source of phospholipases A₂ (PLA₂s), which directly or indirectly influence on the pathophysiological effects caused by envenomation. PLA₂ are usually associated with the local myonecrosis, but also have various effects of pharmacological importance (Abreu et al., 2007; Andrião-Escarso et al., 2002; Barbosa et al., 2005; Calgarotto et al., 2008; Lomonte et al., 1999). In this work, we describe the isolation of a myotoxin (Lys49 PLA2) from *B. alternatus* venom, previously purified by Mamede et al. (2013), which was denominated BaltMTx. We also characterized the effect of

this enzyme on platelet aggregation, antibacterial and antiparasitic activities and inflammatory effects caused by this myotoxin.

BaltMTx was purified by a three-step procedure including ion-exchange, hydrophobic interaction and affinity chromatographies. Crude *B. alternatus* venom (200 mg) was applied to an ion-exchange chromatography DEAE-Sephacel column and produced nine main protein peaks denominated A1 to A9 (Fig. 1A). The A3 fraction was submitted to hydrophobic interaction chromatography on a Phenyl-Sepharose column, resulting in two peaks, denominated P1 and P2 (Fig. 1B). The P1 fraction was further fractionated over an affinity chromatography HiTrap™ Heparin HP column using the ÄKTApurifier™ HPLC system (Fig. 1C). The adsorbed fraction of this chromatography corresponds to the BaltMTx. This toxin was devoid of proteolytic, hemorrhagic, and coagulant activities. The homogeneity of this protein was demonstrated by SDS-PAGE, showing a molecular mass of about 15 and 25 kDa under reducing and non reducing conditions, respectively (Fig 2).

To verify that BaltMtx was the same myotoxin purified by Mamede et al (2013), it evaluated the myotoxic activity. As *B. alternatus* crude venom, BaltMtx showed myotoxic activity (Fig 3). Some studies have suggested that myotoxic PLA₂s may induce muscle cell damage by affecting the integrity of plasmatic membranes, thereby leading to hyper contraction and other intracellular effects (Fully et al., 2003). In general, when acidic PLA₂s present myotoxic activity, this activity is lower when compared to other basic PLA₂s, highly myotoxic (Rosenberg, 1986). These proteins still deserve more studies in an attempt to better understand their mechanisms of action and their potential pharmacological applications.

A large number of substances that affect the hemostatic system is present in snake venoms, including anticoagulant, procoagulant and fibrin(geno)lytic proteins, which act on the wall of blood vessels and interfere platelet aggregation (Du et al., 2006; Markland, 1998). Several platelet aggregation inhibitors have been purified and characterized as metalloproteinases, disintegrins, C-type lectins and PLA₂ (Coelho et al., 1999; Serrano et al., 1999; Zingali et al., 1993).

Several PLA₂s isolated from snake venoms have activity on hemostasis, especially acidic PLA₂s that induce important pharmacological effects as hemolytic and anticoagulant activities and effects on the hypotension and platelet aggregation (Andrião-Escarso et al., 2002; de Albuquerque Modesto et al., 2006; Roberto et al., 2004; Serrano et al., 1999). The PLA₂s interfere on the platelet aggregation by different mechanisms. According to their platelet effects, they can be divided into three groups: class A that includes the PLA₂s able to induce platelet aggregation; class B: PLA₂s that inhibit platelet aggregation induced by several physiological agonist; class C: PLA₂s that present biphasic responses on platelets (pro- and anti-aggregating properties) (Kini; Evans, 1997).

We also evaluated the effect of the BaltMTx on the platelet aggregation. Our results showed that BaltMTx belongs to the B class, because it inhibited platelet aggregation induced by epinephrine in a dose-dependent manner. Different doses of BaltMTx, 3, 1.2 and 0.6 µg, inhibited approximately 69, 54 and 35%, respectively, of the platelet aggregation induced by epinephrine, after pre-incubation with PRP for 30 min (Fig. 4 A). Our results indicate that the inhibition of platelet aggregation induced by toxin depends of a pre-incubation time with PRP (30 min). BaltMTx (3 µg), when not incubated with PRP, showed only traces of inhibition of platelet aggregation (7%) induced by epinephrine (Fig. 4 B). These results suggest that the BaltMTx acts enzymatically on the platelets, since its action is time-dependent. BaltMTx showed a little or no effect on platelet aggregation induced by collagen or ADP (Figs. 4 B, D). These results are contrary to those found by other authors. Roberto et al. (2004) described a recombinant PLA₂ from *B. jararacussu* venom that inhibits platelet aggregation induced by collagen and ADP. Teixeira (2009) and Santos-Filho et al. (2008) found the same results for an isolated PLA₂ from *B. erythromelas* and *B. moojeni* venoms, respectively. Cedro (2014) isolated a PLA₂ from *Bothrops jararaca* that inhibits platelet aggregation induced by ADP. de Albuquerque Modesto et al. (2006) describe an isolated PLA₂ from *B. erythromelas* that showed a potent inhibitory effect on the platelet aggregation induced by arachidonic acid and collagen.

Snake venom PLA₂s interfere with platelet aggregation by different mechanisms. They can cause activation of platelet aggregation by cleaving the

phospholipids present in the membranes of platelets, releasing arachidonic acid and forming its metabolites such as thromboxane A2. They also can cleave the by-products arachidonic acid, thus inhibiting platelet aggregation, or they can act by mechanisms catalysis independent, having the effect mediated by a change in the platelet cytoskeleton associated to an allosteric site (Huang et al., 1997; Kini; Evans, 1997). Wang et al (1996) suggest that Phe20 and Trp21 residues, located in helix short and Trp119 and Phe113, which are located in the C-terminal region, are involved in the inhibition of platelet aggregation induce by PLA₂.

Previous studies have demonstrated the antimicrobial effects of snake venoms and isolated substances. Herein, we also describe the BaltMTx effect on the antibacterial action by growth inhibition against *S. aureus* and *E. coli*. BaltMTx was evaluated for the antibacterial effects according to the microdilution method in the broth. BaltMTx (65 µg) was capable of inhibiting the growth of the bacterium *S. aureus* around 80% (Fig 5 A). The same mass of BaltMTx inhibited around 40% of the growth of the bacterium *E. coli*. (Fig 5 B). The positive control (gentamicin 0.5 µg) was able to inhibit 80% growth of both bacteria (Fig 5 A and B).

Overall, venoms from snakes of the Elapidae and Viperidae families are the most active against bacteria (Stiles et al., 1991), especially those of the genus *Bothrops* (Páramo et al., 1998; Rodrigues et al., 2004; Stábeli et al., 2004). It has been described various PLA₂s from *Bothrops* snake venoms with antibacterial action, such as *B. Asper* (Lomonte et al., 1999a, 1999b; Páramo et al., 1998; Santamaría et al., 2005a, 2005b), *B. neuwiedi pauloensis* (Rodrigues et al., 2004; Soares et al., 2000), *B. jararacussu* (Roberto et al., 2004) and *B. moojeni* (Stábeli et al., 2007).

A Lys49 isolated PLA₂ from *B. asper* venom, and two from *B. brazili* venom (MTX-I and II), have antimicrobial and antifungal activities, which shows that these activities are independent of catalytic activity. Probably the snake venom PLA₂s act against Gram-positive and Gram-negative causing disturbing effects in their membranes by a set of cationic and hydrophobic amino acids found in the C-terminal region (Costa et al., 2008; Nevalainen et al., 2008; Páramo et al., 1998).

Some PLA₂s also have antiparasitic activity, with cytotoxic effect against *Leishmania* sp., such as MjTX-II, a Lys49 PLA₂ isolated from *B. moojeni* that reduced *Leishmania* sp. viability by around 50% in the presence of 75 µg mL⁻¹ of toxin (Stábeli et al., 2006). MTX-I, an Asp49 PLA₂, and MTX-II, a Lys49 PLA₂ from *B. brazili* caused an inhibition of approximately 90% in parasite viability at 100 µg mL⁻¹ concentration, and their respective C-terminal region-derived synthetic peptides (pepMTX-I and pepMTX-II), killed about 70% of *Leishmania* sp. at 120 µg mL⁻¹ (Costa et al., 2008). BnSP-7, a catalytically inactive PLA₂ from *B. pauloensis* snake venom, inhibits the proliferation of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* promastigotes by 60–70% at concentrations of 50–200 µg mL⁻¹ of toxin, and reducing amastigotes viability by 50% at 28·1 µg mL⁻¹ (Nunes et al., 2013). In contrast, BaltMTx had an opposite effect as stimulated the proliferation of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* e *Leishmania* (*Viania*) *braziliensis* at a concentration of 100 mg mL⁻¹ making the viability of *Leishmania* sp was 150%, compared to control (Fig. 6A and 6B). This effect was also demonstrated by Passero et al. (2008), who observed that an isolated PLA₂ from *C. durissus collilineatus* venom stimulates the growth of *L.* (*L.*) *amazonensis* promastigotes and amastigotes. This probably occurred because some PLA₂s appears to be a progression factor for leishmaniasis.

The inflammatory response is a major characteristic of envenomation by *Bothrops* snakes. This reaction involves the release of potent pro-inflammatory mediators that cause vasodilation and extravasation of plasma into the extracellular space. These events are accompanied by the activation of nociceptors, resulting in edema and hyperalgesia (Fernandes et al., 2006; Gutiérrez et al., 2009; Nascimento et al., 2010; Teixeira et al., 2009). The action of both PLA₂s Asp49 and Lys 49 in the disruption of skeletal muscle cells, as well as its role in inflammatory reactions induction associated with edema, cellular infiltration and pain have been widely demonstrated in several studies (Barros et al., 1998; Bonfim et al., 2008; Carneiro et al., 2002; Chavez et al., 2005; Petricevich et al., 2000; Teixeira et al., 2009; Zamuner et al. 2005; Zuliani et al., 2005).

Some inflammatory effects of crude venom and BaltMTx were evaluated using the supernatant of stimulated macrophages in culture. BaltMTx stimulated the production of TNF-α, IL-12, IL-10 and NO (Fig. 7) in a dose-dependent

manner with a statistically significant difference ($p <0.001$). The IL-12 production is around ten times higher than the production of IL-10, which suggest that BaltMtx has pro-inflammatory activity. IL-12 is secreted by macrophages after activation by an antigen-presenting cell and acts on specific receptors of natural killer cells (NK) and T lymphocytes by increasing the secretion of interferon-gamma (IFN- γ) (Eckmann; Kagnoff, 2001; Germann; Rude, 1995).

The proinflammatory activity of BaltMtx was also evidenced by the ability to increasing production of TNF- α . It is synthesized by macrophages, monocytes, neutrophils and T cells. Its main function is to produce a marked cytolysis in neoplastic different lineages, but also causes endothelial changes such as the loss of coagulation decrease function, the chemotactic activity and stimulation of oxidative metabolism phagocytes. Macrophage, when stimulated to produce TNF- α , stimulates the synthesis of endothelial cell adhesion, chemical mediators and cytokine production, including IL-12. Endothelial cells activated by TNF- α release nitric oxide (NO) (Mackay et al., 1993; Tartaglia et al., 1993). BaltMtx also stimulated the release of NO, which has its synthesis induced by macrophages and has vasodilation and regulatory action in the recruitment of leukocytes and cytotoxic action against micro-organisms (Sautebin, 2000). In envenomation by snake bites, NO contributes to the induction of tissue damage due to its capacity to generate peroxynitrite and hydroxyl radicals after the interaction with superoxide ions (Hogg 1992; Radi, 1991), and also in hypotension due to its vasodilating action (Petricevich et al., 2000). BaltMTx caused a mild edema in the first hour after an intraplantar injection of 50 μ g, compared to the control paw, and caused no significant hyperalgesia (data not shown). Thus, BaltMTx contributes very little to edema and hyperalgesia caused by *B. alternatus* envenomation.

There are evidence that the majority of PLA₂ causes pro-inflammatory effects at the bite site (Teixeira et al., 2003). BnSP-7, isolated from *B. pauloensis* induced edema formation and release of IL-6, IL-8, IL-1-1 β (Oliveira et al., 2009). An isolated PLA₂ from *B. atrox* venom provoked the release of IL-6, IL-10 and TNF- α , in addition to leukocytes and eicosanoids (Moreira et al., 2012). Bleu-TX-III, isolated PLA² from *B. leucurus* venom produced IL-1, IL-6 and TNF- α (Marangoni et al., 2013).

In conclusion, we functionally characterized the BaltMTx, a Lys49 PLA₂ homologue from *B. alternans* snake venom. BaltMTx could be of medical interest as a new tool for the development of novel therapeutic agents for the prevention and treatment of thrombotic disorders as well as bactericidal agent.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and Ministério de Ciências e Tecnologia (MCT) of Brazil.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Figures

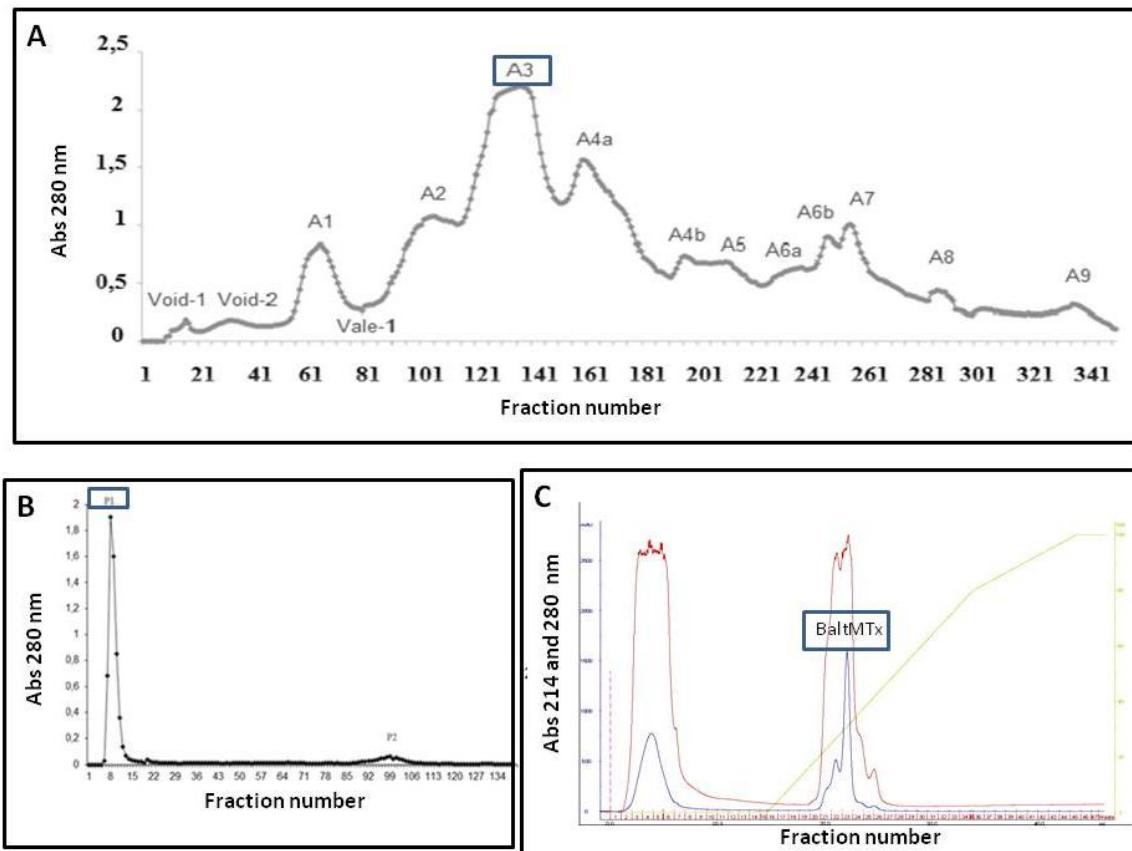


Fig 1. Purification of BaltMTx from *B. alternatus* snake venom. (A) Separation on DEAE-Sephadex ion-exchange chromatography: crude venom (200 mg) was applied to the column (2.5 x 20 cm) and elution was carried out at a flow rate of 20 mL/h with ammonium bicarbonate (Ambic) gradients buffer, pH 7.8, from 0.05 M to 0.6 M. Fractions of 3.0 mL/tube were collected and the absorbance was read at 280 nm. (B) Separation on Phenyl-Sepharose hydrophobic interaction chromatography: A3 fraction was applied to the column (1.5 x 2.5 cm) and elution with a decreasing gradient of NaCl (4 to 0 M), followed by distilled H₂O was achieved at a flow rate of 20 mL/h. Fractions of 3.0 mL/tube were collected and the absorbance was read at 280 nm. (C) Separation by affinity chromatography on a HiTrap™ Heparin HP column using the ÄKTApurifier™ HPLC system: P1 fraction was applied to the column (5 x 1 mL), previously equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 5 mM calcium chloride. The samples were eluted with an increasing concentration gradient of 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 2.0 M sodium chloride

and the absorbance of the fractions was monitored at 280 nm. Fractions of 1.0 mL/tube were collected at a flow rate of 30 mL/h.

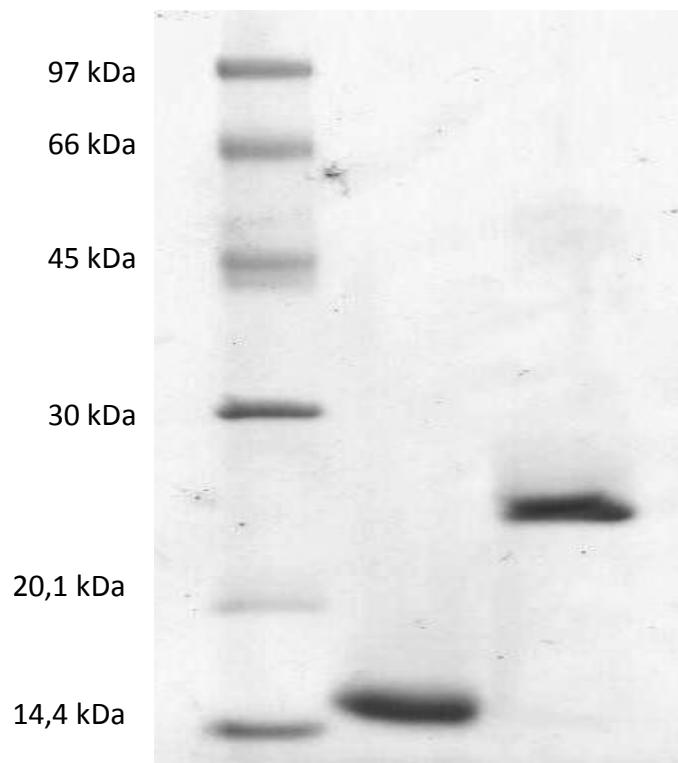


Fig 2. SDS-PAGE in 14% (w/v) gel. Lanes: 1- standard proteins; 2- reduced BaltMTx; 3- non-reduced BaltMTx. The gel was stained with Coomassie blue R-250.

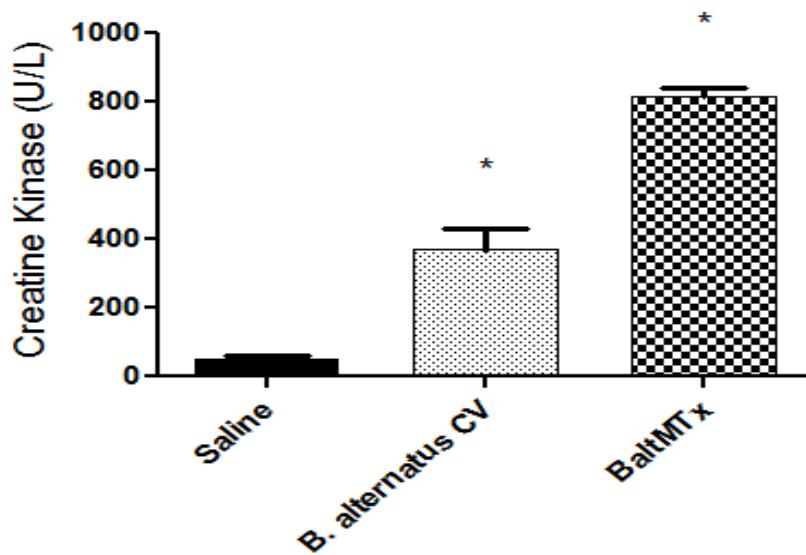
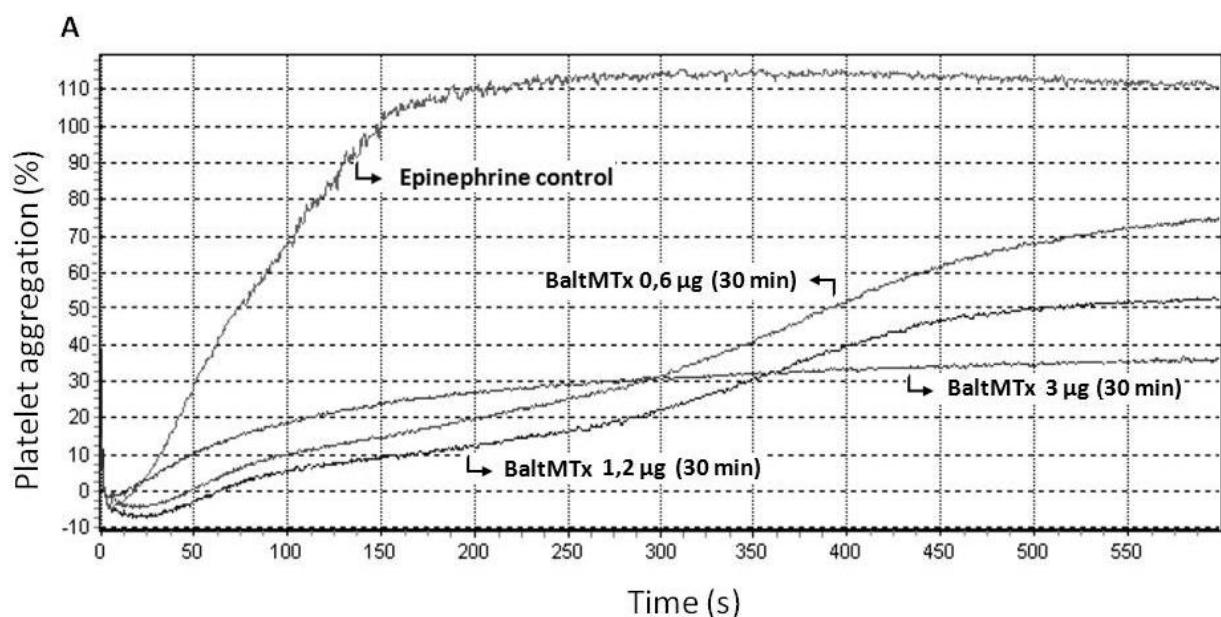
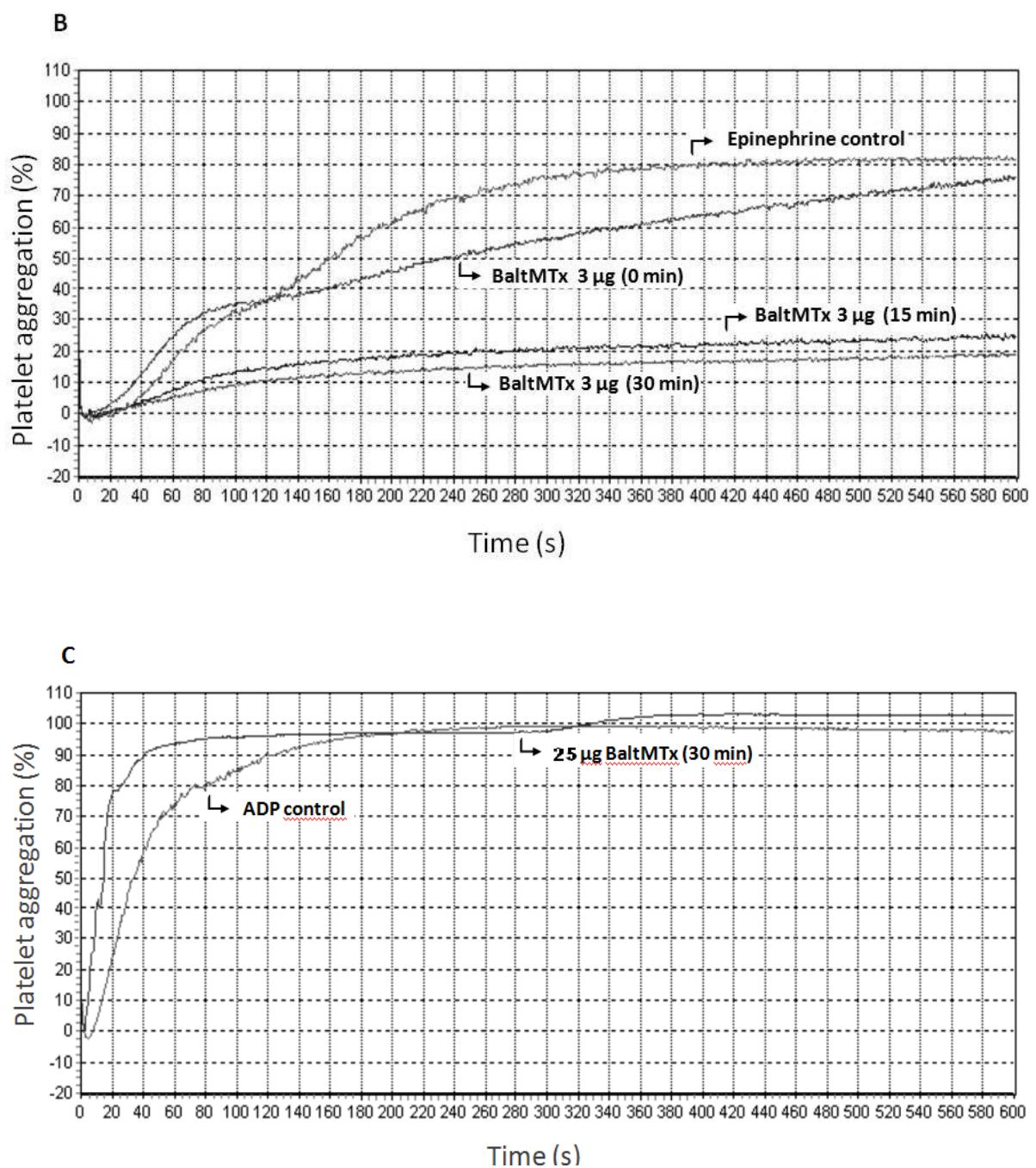


Fig 3. Myotoxic activity of the *B. alternatus* crude venom and BaltMTx: The myotoxic activity was evaluated using a creatine kinase (CK) kit. Activity was expressed as U/L, with one unit corresponding to the phosphorylation of 1 nmol of creatine per minute at 25°C. There was statistically significant difference between groups ($p < 0,05$).





D

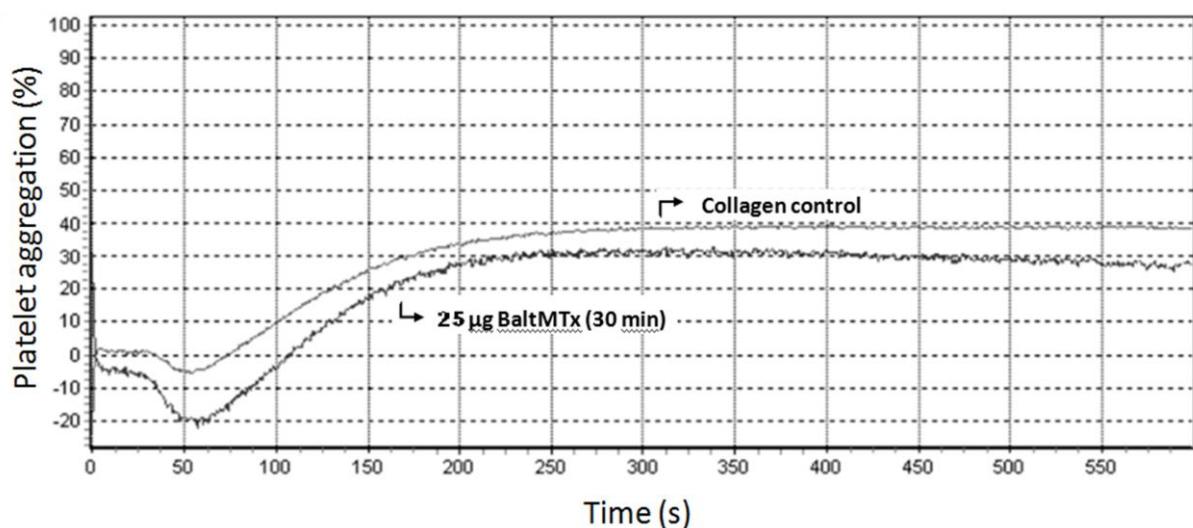


Fig 4. Effect of BaltMTx on (A, B) epinephrine, (C) ADP and (D) collagen-induced platelet aggregation in citrated human PRP. (A) PRP was pre-incubated for 30 min at 37°C in the presence of BaltMTx at various concentrations (0,6, 1,2 and 3 µg) before the addition of epinephrine (300 µM). (B) PRP was pre-incubated for different times (0, 15 and 30 min) at 37°C in the presence of BaltMTx (3 µg) before of the addition of epinephrine (300 µmol/L). (C and D) PRP was pre-incubated for 30 min at 37°C in the presence of BaltMTx (25 µg) before of the addition of ADP (20 µmol/L) and collagen (10 µg/mL). Platelet aggregation was recorded for 10 min in an AggRAM platelet aggregation system with four-channel laser optics (Helena Laboratories, EUA). Results were expressed as an increase in light transmission, where PPP represents the maximum response (100%). Control experiments were performed in the absence of BaltMtx.

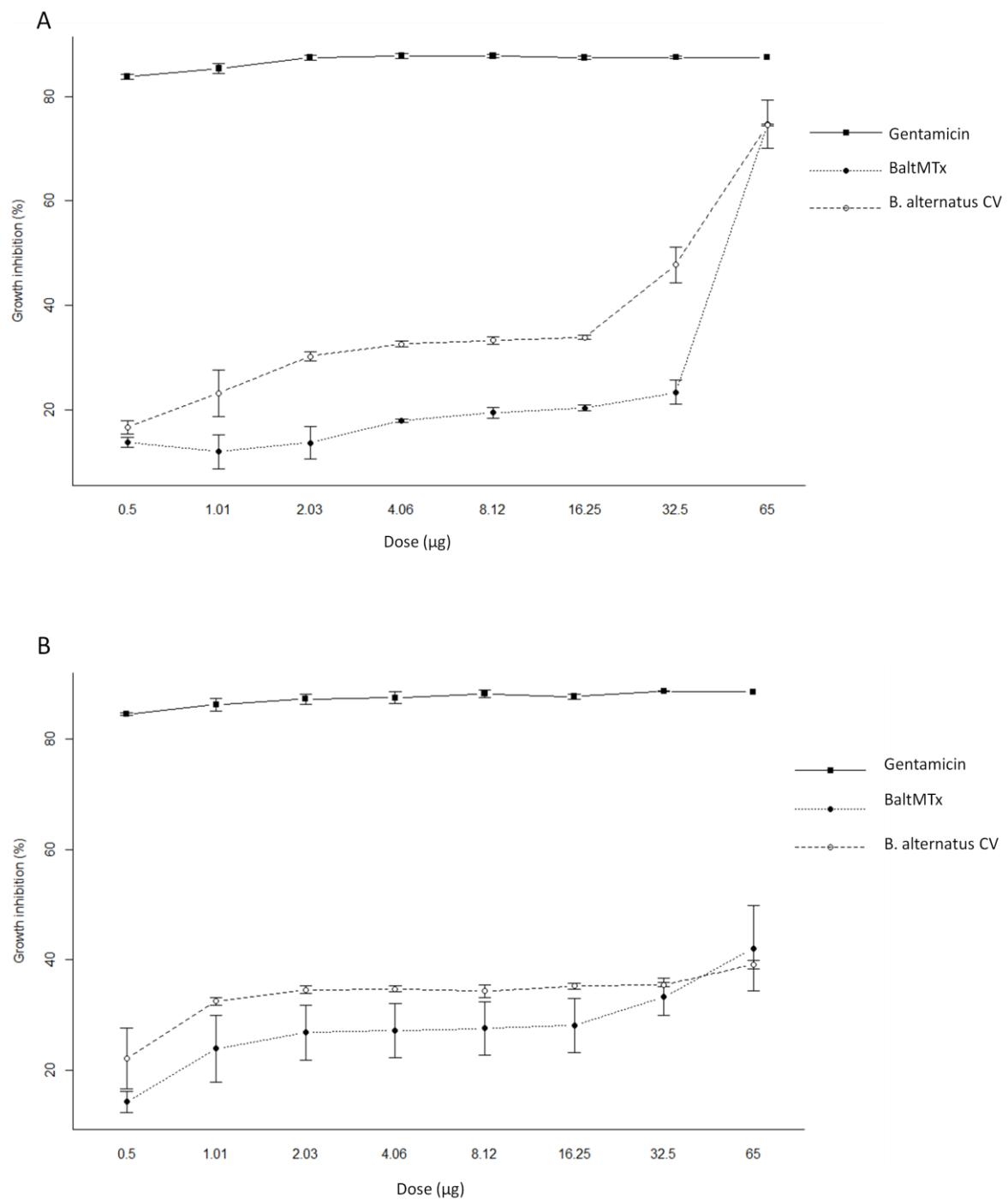


Fig 5. Antimicrobial activity of the *B. alternatus* crude venom and BaltMTx against the growth inhibition of *S. aureus* (A) and *E. coli* (B). Antimicrobial activity was carried out according to the microdilution broth method.

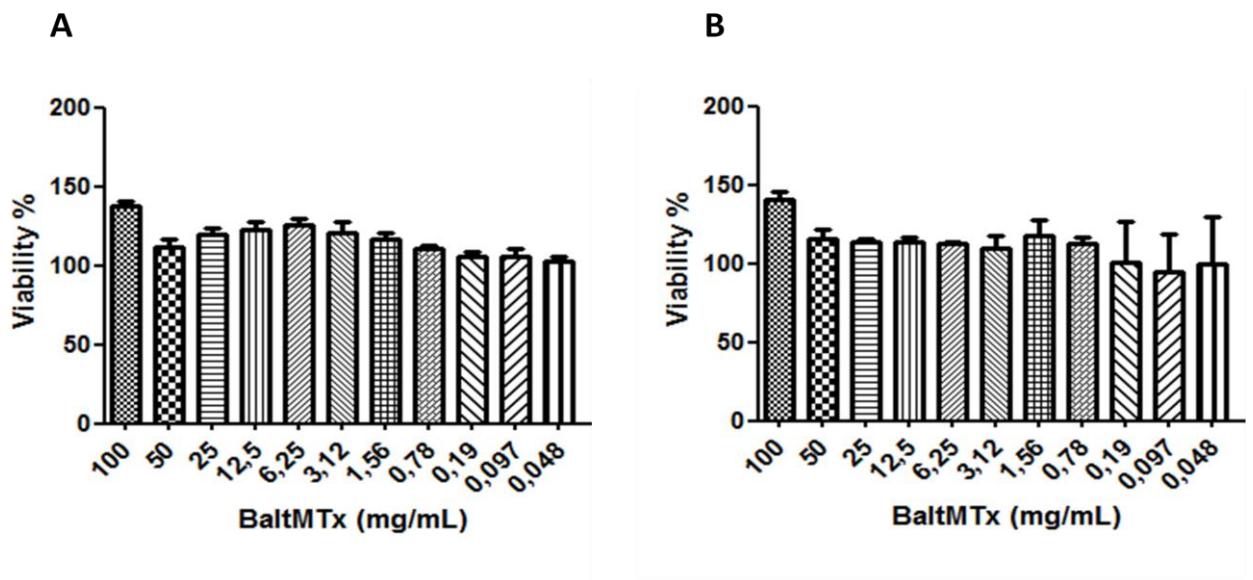
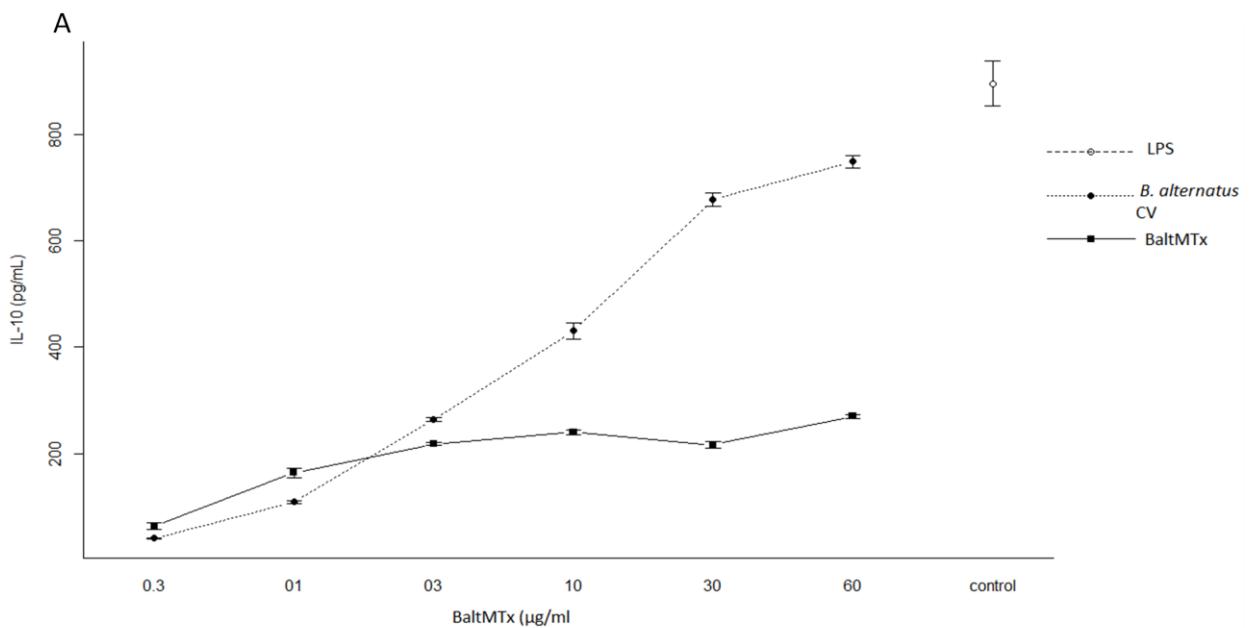
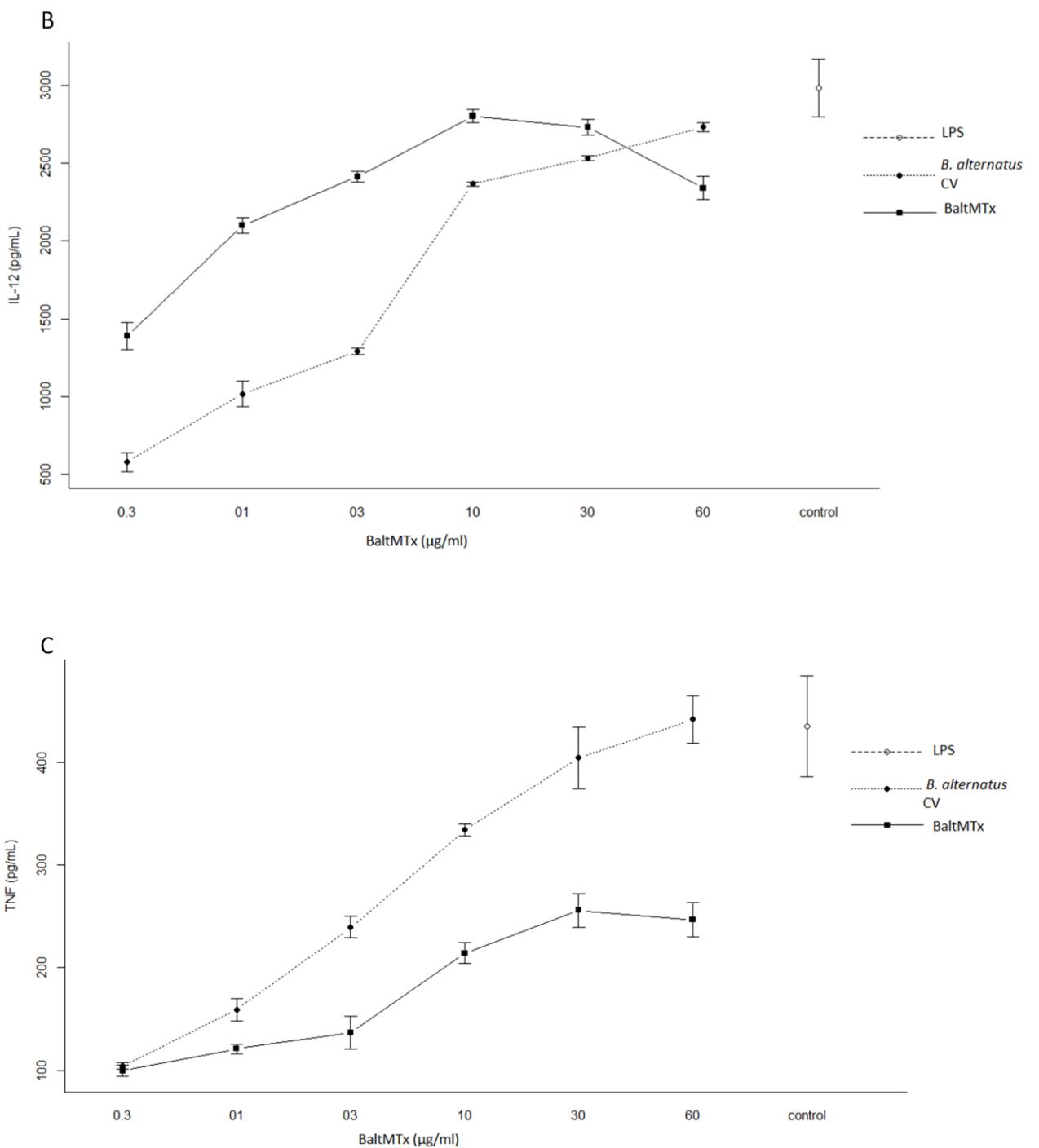


Fig 6. Influence of the BaltMTx in *Leishmania* sp viability. (A) *Leishmania* (*L.*) *infantum* and (B) *Leishmania* (*Viania*) *braziliensis*. Viability assays were performed on parasites by a colorimetric method based on mitochondrial oxidation of MTT reagent. Each assay was carried out in triplicate and independent experiments were performed.





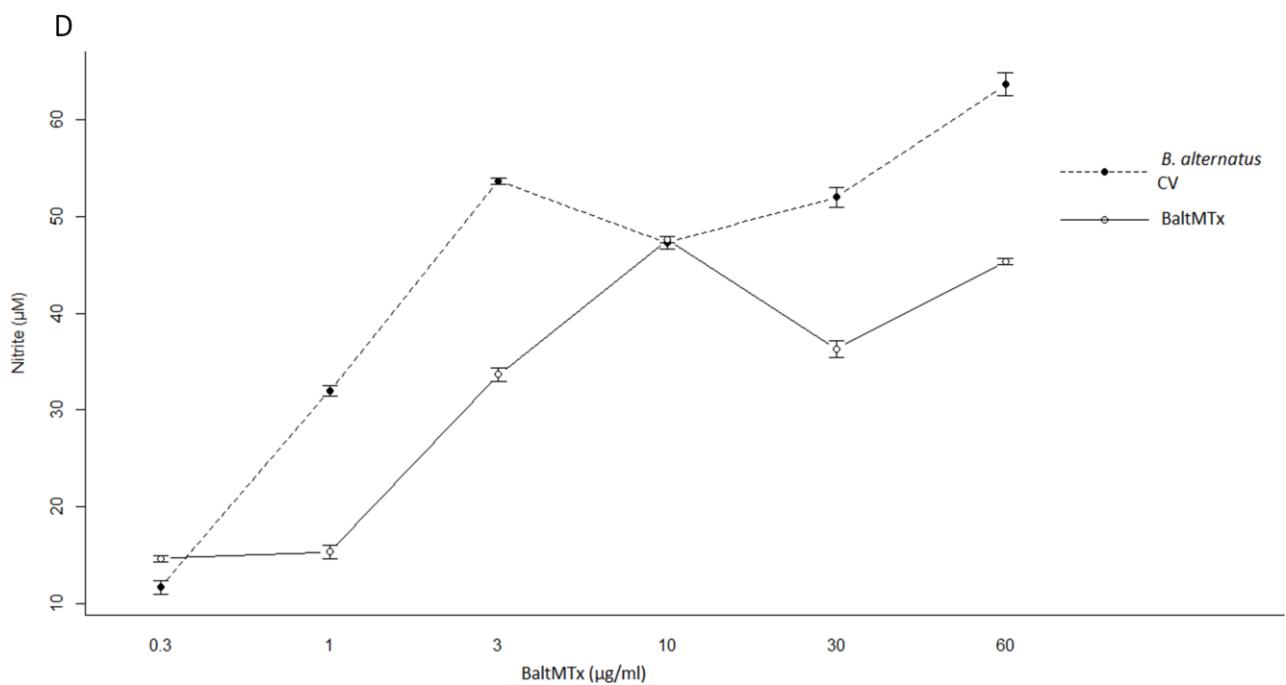


Fig 7. Cytokine and nitrite production for macrophages stimulated in culture medium with crude venom and BaltMTx in different concentrations. Statistical analysis: ANOVA, followed by Tukey, using the R 3.1.2 (R Development Core Team 2009). (A) IL-10 dosing: There was a significant difference between the concentrations ($F_{6,26} = 555.98$; $p <0.001$), less between doses 03, 10 and 30 μg of BaltMTx. There was a difference between the crude venom and BaltMTx ($F_{1,26} = 511.23$; $p <0.001$). (B) IL-12 dosing: There was a significant difference between the concentrations ($F_{6,26} = 173,364$; $p <0.001$), less between doses 1 and 60, 10 and 30, 3 and 60 μg of BaltMTx. There was a difference between the crude venom and BaltMTx ($F_{1,26} = 170.435$; $p <0.001$). (C) TNF- α dosing: There was a significant difference between the concentrations ($F_{6,26} = 60.6452$; $p <0.001$), less between doses 0,3 and 1, 0,3 and 3, 10 and 30, 10 and 60, 30 and 60 μg of BaltMTx, and doses 30 and 60, 10 and 30 of the crude venom. There was a difference between the crude venom and BaltMTx ($F_{1,26} = 79.6296$; $p <0.001$). (D) Nitrite dosing: There was a significant difference between the concentrations ($F_{6,26} = 24.5024$; $p <0.001$), less between doses 10 and 60, 3 and 30 μg of BaltMTx, and doses 3 and 30 μg of the crude venom. There was a difference between the crude venom and BaltMTx ($F_{1,26} = 7.7993$; $p = 0.008$).

References

- Abreu, V. A., Dal Belo, C. A., Hernandes-Oliveira, S. S., Borja-Oliveira, C. R., Hyslop, S., Furtado Mde, F., Rodrigues-Simioni, L., 2007. Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*). Comparative Biochemistry Physiology A. 148(1): 142-149.
- Angulo, Y., Olamendi-Portugal, T., Possani, L.D., Lomonte, B., 2000. Isolation and characterization of myotoxin II from *Atropoides (Bothrops) nummifer* snake venom, a new Lys49 phospholipase A2 homologue. Int J Biochem Cell Biol. v. 32, p. 63-71.
- Andrião-Escarso, S.H., Soares, A.M., Fontes, M.R.M., Fuly, A.L., Corrêa, F.M. a, Rosa, J.C., Greene, L.J., Giglio, J.R., 2002. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. Biochem. Pharmacol. 64, 723–732.
- Barbosa, P.S.F., Martins, a. M.C., Havit, a., Toyama, D.O., Evangelista, J.S. a M., Ferreira, D.P.P., Joazeiro, P.P., Beriam, L.O.S., Toyama, M.H., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S. a, 2005. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. Toxicon 46, 376–386.
- Barros, S.F., Friedlanskaia, I., Petricevich, V.L., Kipnis, T.L., 1998. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. Mediators of Inflammation. v. 7, p. 339-346.
- Bonfim, V.L., de Carvalho, D.D., Ponce-Soto, L.A., Kassab, B.H., Marangoni, S., 2008. Toxicity of phospholipases A2 D49 (6-1 and 6-2) and K49 (Bj-VII) from *Bothrops jararacussu* venom. Cell Biol. Toxicol. 25, 523–532.
- Bradford, M.A., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.

- Calgarotto, A.K., Damico, D.C.S., Ponce-Soto, L.A., Baldasso, P.A., Da Silva, S. L., Souza, G.H.M.F., Eberlin, M.N., Marangoni, S., 2008. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A2 BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 51, 1509–1519.
- Carneiro, A.S., Ribeiro, O.G., Franco, M., Cabrera, W.H.K., Vorraro, F., Siqueira, M., Ibanez, O.M., Starobinas, N., 2002. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon* 40, 1571–1579.
- Chavez, F., Teixeira, C.F.P., Gutiérrez, J.N., 2005. Role of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. *Toxicon* 45, 71–78.
- Cedro, R.C.A. Isolamento e caracterização funcional de uma fosfolipase A2 de *Bothrops jararaca*: Avaliação do potencial antitumoral e inflamatório. 2014. 113 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- Coelho, A.L., de Freitas, M.S., Oliveira-Carvalho, A.L., Moura-Neto, V., Zingali, R.B., Barja-Fidalgo, C., 1999. Effects of jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. *Exp. Cell Res.* 251, 379–387.
- Costa, T.R., Menaldo, D.L., Oliveira, C.Z., Santos-Filho, N. a., Teixeira, S.S., Nomizo, A., Fuly, A.L., Monteiro, M.C., de Souza, B.M., Palma, M.S., Stábeli, R.G., Sampaio, S. V., Soares, A.M., 2008. Myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops brasili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. *Peptides* 29, 1645–1656.
- De Albuquerque Modesto, J.C., Spencer, P.J., Fritzen, M., Valença, R.C., Oliva, M.L.V., da Silva, M.B., Chudzinski-Tavassi, A.M., Guarnieri, M.C., 2006. BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A2 from *Bothrops erythromelas* venom: Isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and

inductor of prostaglandin I₂ release by endothelial cells. Biochem. Pharmacol. 72, 377–384.

Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.H., Magrioti, V., Kokotos, G., 2011. Phospholipase A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention 111, 6130–6185.

Du, X.Y., Sim, D.S., Lee, W.H., Zhang, Y., 2006. Blood cells as targets of snake toxins. Blood Cells, Mol. Dis. 36, 414–421.

Eckmann, L., Kagnoff, M.F., 2001. Cytokines in host defense against *Salmonella*. Microbes Infect, v.3, n.1,p.1191-1200.

Fernandes, C.M., Zamuner, S.R., Zuliani, J.P., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F.P., 2006. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: Leukocyte recruitment and release of cytokines. Toxicon 47, 549-559.

Fuly, A.L., Calil-Elias, S., Martinez, A.M.B., Melo, P.A., Guimarães, J.A., 2003. Myotoxicity induced by an acidic Asp-49 phospholipase A2 isolated from *Lachesis muta* snake venom Comparison with lysophosphatidylcholine. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 35, 1470–1481.

Fuly, A.L., Soares, A.M., Marcussi, S., Giglio, J.R., Guimarães, J. a, 2004. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A2 isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. Biochimie 86, 731–739.

Germann, T., Rude, E., Schmitt, E., 1995. The influence of IL12 on the development of Th11 and Th2 cells and its adjuvant effect for humoral immune responses. Research in Immunology, v. 146,p. 481-486.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 1997. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini, R.M. (Ed.), *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. John Wiley & Sons, England, pp. 321–352.

Gutiérrez, J.M., Escalante, T., Rucavado, A., 2009. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 54, 976-987.

Hogg, N., Darley-Usmar, V.M., Wilson, M.T., Moncada, S., 1992. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide, *Biochem. J.* 281, p. 419-424

Huang, M.Z., Gopalakrishnakone, P.F., Kini, R. M., 1997. Role of enzymatic activity in the antiplatelet effects of a phospholipase A2, from *Ophiophagus hannah* snake venom. *Life Sciences*, v. 61, p. 2211-17.

Izidoro, L.F.M., Ribeiro, M.C., Souza, G.R.L., Sant'Ana, C.D., Hamaguchi, A., Homsi-Brandeburgo, M.I., Goulart, L.R., Beleboni, R.O., Nomizo, A., Sampaio, S. V., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., 2006. Biochemical and functional characterization of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. *Bioorganic Med. Chem.* 14, 7034–7043.

Ketelhut, D.F., deMello,M.H., Veronese, E.L., Esmeraldino, L.E., Murakami, M.T., Arni, R.K., Giglio, J.R., Cintra, A.C., Sampaio, S.V., 2003. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A2 isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie* 85, 983–991.

Kini, R.M., Evans, H.J., 1990. Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon* 28, 1387-1422.

Kini, R. M., Evans, H. J., 1997. Effects of phospholipase A2 enzymes on platelet aggregation. In: Kini RM, editor. *Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism*. England: John Wiley and Sons Ltd. p. 369–87.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–689.

Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón, L., 2003. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 42, 885–901.

Lomonte, B., Angulo, Y., Rufini, S., Cho, W., Giglio, J.R., Ohno, M., Daniele, J.J., Geoghegan, P., Gutiérrez, J.M., 1999a. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. *Toxicon* 37, 145–158.

Lomonte, B., Pizarro-Cerdá, J., Angulo, Y., Gorvel, J.P., Moreno, E., 1999b. Tyr→Trp-substituted peptide 115-129 of a Lys49 phospholipase A2 expresses enhanced membrane-damaging activities and reproduces its in vivo myotoxic effect. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1461, 19–26.

Mackay, F., Loetscher, H., Stueber, D., Gehr, G., Lesslauer, W., 1993. Tumor necrosis factor α (TNF- α)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55 . *J. Exp. Med.* v. 177, p. 1277–1286.

Mamede, C.C.N., de Queiroz, M.R., Fonseca, K.C., de Morais, N.C.G., Filho, S.A.G., Beletti, M.E., Stanziola, L., de Oliveira, F., 2013. Histological and ultrastructural analyses of muscle damage induced by a myotoxin isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. *Protein Pept. Lett.* 20, 192–9.

Marangoni, F.A., Ponce-soto, L.A., Marangoni, S., Cristina, E., Landucci, T., 2013. Unmasking Snake Venom of *Bothrops leucurus*: Purification and Pharmacological and Structural Characterization of New PLA Bleu TX-III 2013, 9 pages.

Markland, F.S., 1998. Snake venoms and the Haemostatic System. *Toxicon* 36, 1749–1800.

Moreira, V., Dos-Santos, M.C., Nascimento, N.G., Silva, H.B., Fernandes, C.M., Lima, M.R.D., Teixeira, C., 2012. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. *Toxicon*, 60, p. 12–20.

Nascimento, N.G., Sampaio, M.C., Olivo, R.A., Teixeira, C., 2010. Contribution of mast cells to the edema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. *Toxicon* 55, 343-352.

Nevalainen, T.J., Graham, G.G., Scott, K.F., 2008. Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1781, 1–9.

Nunes, D.C.O., Figueira, M.M.N.R., Lopes, D.S., De Souza, D.L.N., Izidoro, L.F.M., Ferro, E. a V, Souza, M. a, Rodrigues, R.S., Rodrigues, V.M., Yoneyama, K. a G., 2013. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology* 140, 844–54.

Oliveira, C.F., Lopes, D.S., Mendes, M.M., Homsi-Brandeburgo, M.I., Hamaguchi, A., Alcântara, T.M., Clissa, P.B., Rodrigues, V.M., 2009. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedi) pauloensis* snake venom. *Toxicon* 53, 560–569.

Páramo, L., Lomonte, B., Pizarro-cerdá, J., Bengoechea, J.A., Gorvel, J.P., Moreno, E., 1998. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: Synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)- peptide identifies its bactericidal region. *Eur. J. Biochem.* 253, 452–461.

Passero, L.F.D., Laurenti, M.D., Tomokane, T.Y., Corbett, C.E.P., Toyama, M.H., 2008. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Parasitol. Res.* 102, 1025–1033.

Petricevich, V.L., Teixeira, C.F.P., Tambourgi, D.V., Gutiérrez, J.M., 2000. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with

Bothrops asper and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon* 38, 1253–1266.

Radi, R.B.J.S., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A., 1991. Peroxynitriteoxidation of sulphhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 266, 4244–4250.

Roberto, P.G., Kashima, S., Marcussi, S., Pereira, J.O., Astolfi-Filho, S., Nomizo, A., Giglio, J.R., Fontes, M.R.M., Soares, A.M., França, S.C., 2004. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* venom. *Protein J.* 23, 273–285.

Rodrigues, V.M., Marcussi, S., Cambraia, R.S., De Araújo, A.L., Malta-Neto, N.R., Hamaguchi, A., Ferro, E. a V, Homsi-Brandeburgo, M.I., Giglio, J.R., Soares, A.M., 2004. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. *Toxicon* 44, 305–314.

Rodrigues, R.S., Izidoro, L.F.M., Teixeira, S.S., Silveira, L.B., Hamaguchi, A., Homsi-Brandeburgo, M.I., Selistre-de-Araújo, H.S., Giglio, J.R., Fuly, A.L., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., 2007. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon* 50, 153–165.

Rosenberg, D., 1986. The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons. In: Harris, J.B. (Ed.), *Natural Toxins Animal, Plant and Microbial*. Oxford Science Publications, Oxford, pp. 129–174.

Sajevic, T., Leonardi, A., Krizaj, I., 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 57, 627 - 645.

Sami, R.P., Gopalakrishnakone, P., Ho, B., Chow, V.T.K., 2008. Purification, characterization and bactericidal activities of basic phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon halys* (Chinese pallas). *Biochimie* 90, 1–17.

Santamaría, C., Larios, S., Angulo, Y., Pizarro-Cerda, J., Gorvel, J.P., Moreno, E., Lomonte, B., 2005a. Antimicrobial activity of myotoxic phospholipases A2 from crotalid snake venoms and synthetic peptide variants derived from their C-terminal region. *Toxicon* 45, 807–815.

Santamaría, C., Larios, S., Quirós, S., Gorvel, J., Lomonte, B., Santamari, C., Quiro, S., Pizarro-cerda, J., 2005b. Bactericidal and Antiendotoxic Properties of Short Cationic Peptides Derived from a Snake Venom Lys49 Phospholipase A 2 Bactericidal and Antiendotoxic Properties of Short Cationic Peptides Derived from a Snake Venom Lys49 Phospholipase A 2 49, 1340–1345.

Santana, S.S., Gennari-Cardoso, M.L., Carvalho, F.C., Roque-Barreira, M.C., Santiago, A.D.S., Alvim, F.C., Pirovani, C.P., 2014. Eutirucallin, a RIP-2 type lectin from the latex of *Euphorbia tirucalli* L. presents proinflammatory properties. *PLoS One* 9.

Santos-Filho, N. a., Silveira, L.B., Oliveira, C.Z., Bernardes, C.P., Menaldo, D.L., Fuly, A.L., Arantes, E.C., Sampaio, S. V., Mamede, C.C.N., Beletti, M.E., de Oliveira, F., Soares, A.M., 2008. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I2 inductor phospholipase A2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 52, 908–917.

Sautebin, L., 2000. Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. *Fitoterapia*, 71, Supplement 1(0): S48-S57.

Serrano, S.M., Reichl, a P., Mentele, R., Auerswald, E. a, Santoro, M.L., Sampaio, C. a, Camargo, a C., Assakura, M.T., 1999. A novel phospholipase A2, BJ-PLA2, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. *Arch. Biochem. Biophys.* 367, 26–32.

Soares, a M., Guerra-Sá, R., Borja-Oliveira, C.R., Rodrigues, V.M., Rodrigues-Simioni, L., Rodrigues, V., Fontes, M.R., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R., 2000. Structural and functional characterization of BnSP-7, a

Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. Arch. Biochem. Biophys. 378, 201–209.

Soerensen, B., 2000. Produção de soros antipeçonhentos e características imunológicas de cada soro. Anavenenos. In: SOERENSEN, B. *Acidentes por animais peçonhentos. Reconhecimento, clínica e tratamento.* São Paulo: Atheneu. p.91-107.

Stábeli, R.G., Amui, S.F., Sant'Ana, C.D., Pires, M.G., Nomizo, A., Monteiro, M.C., Romão, P.R.T., Guerra-Sá, R., Vieira, C. a., Giglio, J.R., Fontes, M.R.M., Soares, A.M., 2006. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol. 142, 371–381.

Stábeli, R.G., Marcussi, S., Carlos, G.B., Pietro, R.C.L.R., Selistre-De-Araújo, H.S., Giglio, J.R., Oliveira, E.B., Soares, A.M., 2004. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. Bioorganic Med. Chem. 12, 2881–2886.

Stábeli, R.G., Sant'Ana, C.D., Ribeiro, P.H., Costa, T.R., Ticli, F.K., Pires, M.G., Nomizo, A., Albuquerque, S., Malta-Neto, N.R., Marins, M., Sampaio, S. V., Soares, A.M., 2007. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization. Int. J. Biol. Macromol. 41, 132–140.

Soares, A.M., 2007. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. Int J Biol Macromol 41: 132-140.

Stiles, B.G., Sexton, F.W., Weinstein, S. a., 1991. Antibacterial effects of different snake venoms: Purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. Toxicon 29, 1129–1141.

Tartaglia, L.A, Goeddel, D.V., Reynolds, C., Figari, I.S., Weber, R.F., Fendley, B.M., Palladino Jr, M.A., 1993. Stimulation of human T-cell proliferation by

specific activation of the 75- kDa tumor necrosis factor receptor. *J. Immunol.* v. 151, p. 4637–4641.

Teixeira, C.F.P., Landucci, E.C.T., Antunes, E., Chacur, M., Cury, Y., 2003. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon* 42, 947–962.

Teixeira, C., Cury, Y., Moreira, V., Picolo, G., Chaves, F., 2009. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon* 54, 67-76.

Theng, C.M., Chen, Y.H., Ouyang, C., 1984. Purification and properties of the main coagulant and anticoagulant principles of *vipera russelii* snake venom 786, 204–212.

van Deenen, L.L.M., de Haas, G.H., 1963. The substrate specificity of phospholipase A2. *Biochem. Biophys. Acta* 70, 538–553

Wang, X., Yang, J., Gui, L., Lin, Z., Chen, Y., Zhou, Y., 1996. Crystal structure of an acidic phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon halys pallas* at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol*, v. 255, p. 669-76.

Zamuner, S.R., Zulliani, J.P., Fernandes, C.M., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F.P., 2005. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. *Toxicon*. v. 46, p. 806-813.

Zingali, R.B., Jandrot-Perrus, M., Guillen, M.C., Bon, C., 1993. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: Characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry* 32, 10794–10802.

Zuliani, J.P., Fernandes, C.M., Zamuner, S.R., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F.P., 2005. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* venom: role of catalytic activity. *Toxicon* 45, 335–346.

Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa

Mônica - Uberlândia-MG -

CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;

www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 028/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 108/12

Projeto Pesquisa: "Caracterização funcional, biológica e estrutural de proteases purificadas de peçonhas de serpentes brasileiras".

Pesquisador Responsável: Fábio de Oliveira

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

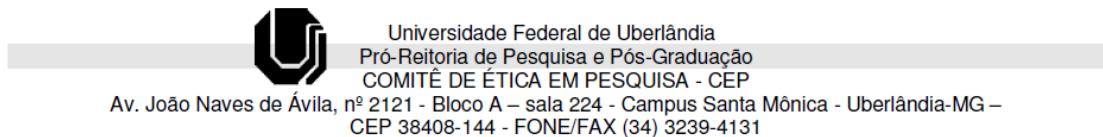
SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 05 de Fevereiro de 2013

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



ANÁLISE FINAL Nº. 564/11 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU
055/11

Projeto Pesquisa: "Purificação e caracterização de toxinas de serpentes do gênero Bothrops com ação na hemostasia".

Pesquisador Responsável: Fábio de Oliveira

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

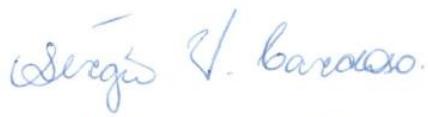
SITUAÇÃO: PROTOCOLO APROVADO

Entrega de Relatório Parcial: **Abril de 2012.**

Entrega de Relatório Final: **Dezembro de 2012.**

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 09 de setembro de 2011.


/ Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU