


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VARIABILIDADE NA EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE
FOSFOLIPASES A₂ ÁCIDAS EM PEÇONHAS DE SERPENTES
IRMÃS DA ESPÉCIE *Bothrops moojeni* (VIPERIDAE,
CROTALINAE).

LUIZ CARLOS GEBRIM DE PAULA COSTA


Universidade Federal de Uberlândia
Prof.ª Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Monografia apresentada à coordenação do curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia-MG

Abril-2002

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**VARIABILIDADE NA EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE
FOSFOTENES A₂ ÁCIDAS EM PEÇONHAS DE SERPENTES
IRMÃS DA ESPÉCIE *Bothrops moojeni* (VIPERIDAE,
CROTALINAE).**

LUIZ CARLOS GEBRIM DE PAULA COSTA

MARIA INÊS HOMSI BRANDEBURGO

Monografia apresentada à coordenação do curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia-MG

Abril-2002

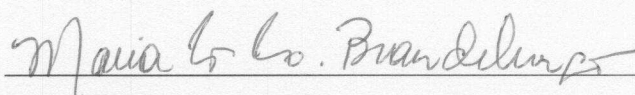
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VARIABILIDADE NA EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE
FOSFOLIPASES A₂ ÁCIDAS EM PEÇONHAS DE SERPENTES
IRMÃS DA ESPÉCIE *Bothrops moojeni* (VIPERIDAE,
CROTALINAE).

LUIZ CARLOS GEBRIM DE PAULA COSTA

Aprovada pela Banca Examinadora em 18 / 04 / 02

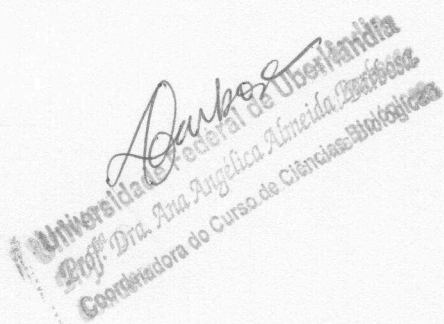
NOTA 100,0.



Prof^a. Dr^a. Maria Inês Homs Brandeburgo

Prof^a. Dr^a. Amélia Hamaguchi

Prof. Mcs. Luiz Fernando Moreira Izidoro


Universidade Federal de Uberlândia
Prof^a. Dra. Ana Angélica Almeida
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia, _____ de _____ de _____.

**Sonhas fugir;
mas não fujas para seres livre.
Se fugires de ti próprio, tua prisão.
Fugirá contigo.
_ Gustave thiobon, filósofo francês.**

ABREVIATURAS

Asp - Aspartato

BhTL - "Thrombin-like" de *Bothrops moojeni*

BM - *Bothrops moojeni*

CM - Carboximetil

DEAE - Dietilaminoetil

EDTA - Ácido etilnodiaminotetracético

Glu - Glutamato

MA - Miliamper

MOO- 2 - Fosfolipase A₂ básica

MOO- 3 - Serino protease básica

MPB - Metaloprotease básica

nm - Nanômetro

PAF - Fator de agregação plaquetária

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

P/ V - Peso por volume

PLA₂ - Fosfolipase A₂

SDS - Dodecil sulfato de sódio

rpm - rotações por minuto

TEMED - N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamino

Tris - tris (hidroximetil) aminometano

V/V - volume por volume

RESUMO

As fosfolipases A₂ (PLA₂) estão presentes em altas concentrações em peçonhas de serpentes. Estas enzimas catalisam a hidrólise do grupo 2 acil éster do fosfoglicerídeo, liberando ácidos graxos e lisofosfatídeos. Um destes ácidos é o araquidônico, precursor de eicosanóides, que desencadeiam reações inflamatórias. Usualmente peçonhas de uma única espécie contêm várias isoformas de PLA₂. Este trabalho teve como objetivo purificar as isoformas de PLA₂s ácidas da peçonha de *Bothrops moojeni* e comparar a atividade PLA₂ específica e o perfil eletroforético com o das peçonhas de irmãs, nascidas e criadas em cativeiro sob as mesmas condições. As duas frações com atividade PLA₂s (G5 e G6) foram purificadas partindo de um "pool" de peçonhas de *B. moojeni*, por cromatografia em CM-Sephrose Fast Flow seguida de uma DEAE-Sephadex A-25. Na eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes, ambas as frações apresentaram uma banda principal de peso molecular de aproximadamente 15.000; em condições nativas (pH 8,3) as enzimas apresentaram bandas majoritárias com mobilidade eletroforética diferentes. Nas peçonhas das irmãs que apresentaram as duas PLA₂ (G5 e G6) observa-se duas bandas mais fracas e de mesma intensidade, já as outras que possuem somente uma PLA₂ (G5), apresentaram banda única de maior intensidade. A atividade PLA₂ específica das irmãs com as duas isoformas foi menor que a daquelas que possuíam somente uma PLA₂. A variabilidade observada deve-se a diferenças qualitativas e quantitativas na expressão gênica desta isoformas.

Palavras Chaves; peçonha, fosfolipase A₂ e isoforma.

SUMÁRIO

1- <u>INTRODUÇÃO</u>	01
2- <u>OBJETIVOS</u>	08
3- <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	09
3. 1- Material	09
3. 2- Equipamentos	10
3. 3- Métodos	10
3. 3. 1- Fracionamento da peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> em gel de CM- Sepharse	10
3. 3. 2- Recromatografia da fração M1a da peçonha de <i>B. moojeni</i> em DEAE- Sephadex A-25	10
3. 3. 3.-Dosagem protéica	11
3. 3. 4- Eletroforese em gel de poliacrilamida	11
3. 3. 4. 1- Preparação dos géis	11
3. 3. 4. 2- Em condições desnaturantes	12
3. 3. 4. 3- Sem condições desnaturantes em pH alcalino	13
3. 3. 5- Atividade fosfolipásica	14
4- <u>RESULTADOS</u>	15
4. 1- Fracionamento da peçonha de <i>B. moojeni</i> em CM- Sepharse Fast flow	15
4. 2- Recromatografia de M1a da peçonha de <i>B. moojeni</i> em DEAE- Sephaedex – 25	18
4. 3- Eletroforeses	19
4. 3. 1- Condições desnaturantes	19
4. 3. 2- Condições nativas em pH alcalino	20
4. 4- Atividade fosfolipásica	21
5- <u>DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</u>	23
6- <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</u>	27

1- INTRODUÇÃO

As serpentes da família Viperidae são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil. Cerca de 20.000 casos são relatados anualmente, com taxa de mortalidade de 0,5%. 80% dos casos ocorrem com as serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*, excedendo aqueles causados por serpentes do gênero *Micrurus* (família Elapidae) e *Lachesis* (família Viperidae) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, citado por CHAVEZ-OLORTEGHI et al, 1997). Na região do Triângulo Mineiro-MG os envenenamentos pelas serpentes do gênero *Bothrops* representam 80% dos casos, em especial com a espécie *B. moojeni* (caiçaca) (NISHIOKA & SILVEIRA, 1992).

As serpentes botrópicas habitam ambientes úmidos; como matas, áreas de cultivo e locais de proliferação de roedores, possuem hábitos noturnos, são muito agressivas e quando se sentem ameaçadas atacam em silêncio. A espécie *B. moojeni* tem distribuição geográfica estendendo-se do Brasil Central até o sul do estado do Paraná (HOGE & ROMANO, 1972).

A peçonha destas serpentes é produzida e secretada por um par de glândulas localizadas ao lado da maxila, cada uma ligada por um ducto ao dente. As serpentes da família Viperidae possuem um aparelho inoculador mais eficiente em termo de velocidade e quantidade de peçonha injetada, pois apresentam dentição solenóglifa (STORER et al, 1989). Esta consiste de um

par de dentes muito desenvolvidos, providos de um canal central que se comunica com o canal secretor da glândula (BARRAVIEIRA, 1994). As conexões frouxas entre os ossos da cabeça destas serpentes e a extrema mobilidade dos mesmos devido a músculos craniais apropriados possibilitam o direcionamento das presas para frente, em posição de ataque, permitindo que a serpente possa ferir e inocular a peçonha enquanto sua boca permanece aberta formando um ângulo de 180°, portanto são serpentes que picam suas presas (POUGH et al, 1993).

As peçonhas são misturas complexas de componentes tóxicos que possuem diversas formas de ação em presas e que podem vitimar seres humanos. Esses componentes consistem principalmente de proteínas (90%), compreendendo grande variedade de enzimas e toxinas não enzimáticas (SCHMIDT et al, 1976) que têm como funções primárias matar ou imobilizar suas presas, e ajudar na digestão. A parte não protéica é representada por carboidratos, lipídeos e compostos de baixo peso molecular como nucleosídeos e diversos íons (CHIPPAUX et al, 1991).

A ação da peçonha pode desencadear severas desordens metabólicas devido à atividade proteolítica, coagulante, hemorrágica e necrose local (AMARAL et al, 1985). Embora raramente fatais, os casos de envenenamentos ofídicos ocorridos com serpentes botrópicas, se agravam devido à intensidade dos efeitos locais. Observa-se eritema e edema, este último tão intenso e prolongado que pode causar a compressão dos tecidos e vasos, resultando em isquemias e aumentando a necrose do tecido. Dependendo do tempo transcorrido até o tratamento da vítima, a amputação da área afetada poderá ser necessária (OLIVEIRA, 1999). A necrose do córtex renal é uma freqüente e séria complicação do envenenamento botrópico (DA SILVA et al, 1979). Vasoespasmos, nefrotoxicidade direta da peçonha e/ou coagulação intravascular disseminada, levando a oclusão vascular e isquemias, são hipóteses do mecanismo patogênico que explicam a necrose observada (BASU et al, 1977).

Toxinas e enzimas como as hemorraginas, proteases inespecíficas, fosfolipases A₂ entre outras provocam estas atividades por efeitos cumulativos e/ou sinérgicos (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995).

Os fatores hemorrágicos (hemorraginas) são metaloproteínas contendo Zn⁺⁺, que apresentam grande diversidade em relação ao peso molecular. O mecanismo de ação destas enzimas consiste na degradação das proteínas da matriz extracelular e pelo efeito citotóxico direto nas células endoteliais, sua ação ocorre quase que exclusivamente na membrana basal dos vasos capilares (BARRAVIEIRA, 1994), promovendo sua dissolução. Observa-se nas vítimas quadros hemorrágicos como: equimoses, sangramentos gengivais, viscerais.

A base do fenômeno de coagulação consiste na conversão de pró-trombina, uma alfa-2-globulina presente no plasma, para trombina. Esta última age sobre o fibrinogênio, produzindo a fibrina que se polimeriza e se deposita sob a forma de, formando uma rede tridimensional que aprisiona eritrócitos, leucócitos e plaquetas, formando assim o coágulo sanguíneo.

Dentre as proteases existem as enzimas fibrinogenolíticas que atuam sobre o fibrinogênio, podendo hidrolisar suas cadeias (A α , B β e γ), levando a incoagulabilidade sanguínea (HUANG et al, 1993).

Outro grupo de proteases são as enzimas "Thrombin-like", que são classificadas como serino-proteases. Estas enzimas convertem o fibrinogênio em fibrina liberando os fibrinopeptídeos A e B, formando, portanto o microcoágulo de fibrina, porém as "Thrombin-like" não ativam o Fator XIII, responsável por unir de forma cruzada os monômeros de fibrina, aumentando a força de coágulo. Deste modo o coágulo fica mais suscetível à degradação pela plasmina, induzindo assim um estado de desfibrinogenação "*in vivo*" (FAN et al, 1999).

Um dos componentes principais da peçonha é a enzima termoestável fosfolipase A₂ (PLA₂) (E.C.3.1.1.4), que tem como substrato os fosfolipídios que são constituintes da membrana plasmática celular. Com a ação da enzima, os fosfolipídios são hidrolisados, desestruturando a membrana e comprometendo sua permeabilidade seletiva. A hidrólise ocorre especialmente

na ligação acil na posição sn-2 do fosfoglicerídeo (MOLLIER et al, 1990) liberando ácidos graxos e lisofosfatídeos. Muitas vezes um destes ácidos graxos é o ácido araquidônico, que é o precursor de eicosanóides, incluindo prostaciclina, tromboxano e outras prostaglandinas, que desencadeiam reações inflamatórias (KUDO et al, 1993). Os lisofosfatídeos liberados podem ser convertidos em fator de ativação plaquetária (PAF), o qual junto com os eicosanóides são potentes mediadores celulares (DENNIS, 1997).

As PLA₂s são encontradas tanto no interior como no exterior da célula (BOSCH, 1980). As PLA₂s intracelulares estão frequentemente associadas a membranas e envolvidas com o metabolismo de fosfolípidios, transdução de sinais e outras variedades de funções celulares (MUKHERJEE et al, 1994). As extracelulares foram divididas em três classes: I, II e III, com base no número de resíduos de aminoácidos e posição das ligações dissulfeto (RENETSEDER et al, 1985; DENNIS, 1997), estas são proteínas pequenas de 119 a 143 resíduos de aminoácidos com peso molecular variando de 12.000 a 15.000. As PLA₂s de serpentes estão todas reunidas nos grupos I e II. As do grupo I são encontradas, principalmente em peçonhas elapídicas e hidrofídicas, e as do grupo II nas peçonhas de serpentes crotálicas e viperídeas. A principal diferença estrutural encontrada nestas classes de proteínas, está localizada nas pontes dissulfeto formadas entre os resíduos de meia cistina 11 e 77 no grupo I, e 51 e 133 para as PLA₂ do grupo II (ARNI & WARD, 1996).

A conformação catalítica da PLA₂ é estabilizada pelo íon cálcio ligada no resíduo de aspartato na posição 49 (Asp 49) (VERHEIJ et al, 1980). A substituição conservativa Asp→Glu 49 reduz a afinidade pelo cálcio em 12 vezes levando a uma perda da atividade catalítica (LI et al, 1994).

Outras atividades tóxicas independentes da função catalítica primária também estão associadas às PLA₂ de peçonhas de serpentes: miotóxica (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995), edematogênica (LLORET & MORENO, 1993), agregação plaquetária (YUAN et al, 1993), hemolítica indireta (CONDREA et al, 1981), hipotensiva (HUANG, 1984) e cardiopéssica (FLETCHER et al, 1981).

A necrose muscular pode ser devida à ação direta de PLA₂s miotóxicas sobre a membrana plasmática das células musculares, ou indireta, como por consequência de degenerações vasculares e isquêmicas, causadas por hemorraginas. As PLA₂s miotóxicas de serpentes botrópicas podem ser divididas em duas classes: uma com atividade catalítica, as miotoxinas Asp 49, e outra, onde o resíduo Asp 49 é substituído por lisina 49, tornando-as cataliticamente inativas (MARAGONORE et al, 1984). Também existem alguns polipeptídeos básicos não enzimáticos, isolados de peçonhas de cascavéis, tais como a crotamina de *Crotalus viridis viridis*, que danificam as fibras musculares (CAMERON & TU, 1978).

É comum a mesma espécie de serpentes conter várias isoformas de PLA₂ (VALIENTE et al, 1992; FUKAGGAWA et al, 1993), como tem sido demonstrado por cromatografia e eletroforese de peçonhas de serpentes (DUBORDIEU et al, 1987). HOMSI-BRANDEBURGO et al (1988) isolaram da peçonha de *Bothrops jararacussu* duas PLA₂ ácidas, uma neutra e duas miotoxinas com estrutura de PLA₂; CHIOU et al (1991) isolaram da peçonha de *Naja naja atra* três isoformas de PLA₂; DANIELE et al (1997) purificaram uma nova PLA₂ da peçonha de *B. neuwiedi* com propriedades cromatográficas e citotóxicas distintas das isoformas previamente isoladas; LÔBO de ARAUJO et al (1994) demonstraram que a peçonha de *B. lanceolatus* apresenta uma mistura de várias isoformas, sendo que as duas mais expressivas diferem em seus pontos isoelétricos e composição de aminoácidos. A caracterização e comparação destas isoformas são importantes para a compreensão do mecanismo fundamental de variação existente entre estas proteínas.

MONTEIRO et al (1997; 1998), demonstraram que as peçonhas de serpentes individuais apresentam diferenças no conteúdo de toxinas específicas. VALIENTE et al, (1992) detectaram a variabilidade individual de isoformas de PLA₂ quando compararam a peçonha de oito indivíduos adultos de *B. asper*, e evidenciaram que duas isoformas encontravam-se presentes em somente duas amostras de peçonha. As causas atribuídas a esta variabilidade individual podem ser: variações sazonais, dieta, idade, sexo, alimentação

dentre outras (CHIPPAUX et al, 1991; LOMONTE & CARMONA, 1992; FURTADO et al, 1991).

Trabalhando com a peçonha de *B. moojeni*, CARDOSO (2000), observou a variabilidade no perfil eletroforético nas peçonhas de serpentes irmãs, nascidas e mantidas em cativeiro sob as mesmas condições. Posteriormente, MAGRIN (2000) isolou uma PLA₂ básica da peçonha e quando comparou o perfil eletroforético desta enzima com o das peçonhas das irmãs, verificou que nem todas apresentaram a banda correspondente à PLA₂. Esta variação observada pode ser devida a diferentes genes distribuídos na população (LOMONTE & CARMONA, 1992), pois todos os outros fatores que poderiam causar a variabilidade (dieta, idade, etc) foram mantidos constantes.

O conhecimento da composição e toxicidade das peçonhas individuais de serpentes é importante na seleção dos espécimes para a produção dos antisoros, pois a variabilidade pode limitar a sua capacidade de neutralização (MOURA-DA-SILVA et al, 1991). No momento da preparação das frações de peçonhas com atividade farmacológicas para servirem de instrumentos de pesquisa ou de terapia é essencial a escolha da peçonha que seja rica no componente de interesse.

O isolamento de componentes presentes nas peçonhas é um instrumento útil na identificação de seus efeitos tóxicos, possibilitando o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes para as vítimas de acidentes ofídicos. A peçonha de *B. moojeni* é muito estudada e abaixo seguem algumas de suas toxinas já isoladas:

- a Batroxobina, que tem atividade coagulante (STOCKER & BARLOW, 1976);
- uma enzima proteolítica, a moojeni protease A (ASSAKURA et al, 1985) esta enzima hidrolisa imunoglobulinas (ASSAKURA & MANDELBAUM, 1990), colágeno tipo 1, gelatina, fibrinogênio, fibrina e a cadeia B oxidada da insulina (REICHL & MANDELBAUM, 1993);

- REICHL et al (1989) isolaram uma PLA₂ ácida, a BM-PLA₂, esta não é tóxica e também não causa hemorragia e edema.
- SERRANO et al (1993) isolaram a MPB, uma metaloproteínase básica, esta possui ação sobre a caseína, e não causa hemorragia.
- SOARES et al (1998) purificaram uma miotoxina denominada Lys-49 Miotoxin II.
- uma PLA₂ básica, a MOO-1 que produz necrose nas células musculares (MOURA-DA-SILVA et al 1991).
- A MOO3, uma serino protease básica que é ativa sobre a caseína e fibrinogênio (OLIVEIRA, et al, 1999).
- OLIVEIRA, (2001), isolou e caracterizou uma enzima coagulante (BthTL) e quatro novas fibrinogenases.

2- OBJETIVOS

- isolar por cromatografia de troca iônica, as PLA₂(s) presente(s) na fração M1a da peçonha de *B. moojeni*;
- determinar a atividade específica, mobilidade eletroforética e peso molecular aproximado da(s) enzima(s) purificada(s);
- correlacionar por eletroforese em gel de poliacrilamida, a presença ou não destas enzimas em peçonhas de serpentes irmãs nascidas e criadas em cativeiro, sob as mesmas condições;
- comparar as atividades PLA₂ das peçonhas das serpentes irmãs com a(s) enzima(s) purificada(s).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Material

- As peçonhas das serpentes irmãs (S1 a S6) e o “pool” de peçonhas usado para o fracionamento foram cedidos pela Prof^a Msc Vera Lúcia de Campos Brites, do setor de Répteis da UFU, sendo posteriormente liofilizados e armazenados a -20° C.
- Os camundongos da raça Swiss (25 a 30g) machos foram cedidos pela Pentapharm, sendo mantidos no Laboratório da Química de Proteína e Produtos Naturais da UFU.
- Foram utilizadas as resinas:
 - CM Sepharose Favr Flow (Amersham Pharmacia)
 - DEAE Sephadex A-25 (Amersham Pharmacia)
- Reagentes: Acrilamida, Azul de Bromo Fenol, β -mercaptoetanol, Bis-Acrilamida, Coomassie Blue R-250, Desoxicolato de Sódio, EDTA, Fibrinogênio bovino, Persulfato de Amônio, SDS, Soroalbumina Bovina, TEMED, Tris, produtos da Sigma Chem. Co. USA.
- Os demais reagentes utilizados como: HCl, NaOH, CaCl_2 , álcool etílico e metílico foram utilizados em grau analítico.

3.2- Equipamentos

Agitador magnético, banho- maria, balança, centrífuga, coletor de frações, cuba para eletroforese, espectrofotômetro, liofilizador e pHmetro.

3.3- Métodos

3.3.1- Fracionamento da peçonha de *Bothrops moojeni* em gel de CM-Sepharose Fast Flow

Cerca de 200mg da peçonha de *B. moojeni* foram dissolvidos em 1,5 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH 7,8. Em seguida a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi aplicado a uma coluna de troca iônica CM- Sepharose Fast Flow (30 cm x 1,5 cm) e equilibrada com o mesmo tampão. A amostra foi eluída em temperatura ambiente pelo estabelecimento de um gradiente convexo de concentração com o tampão bicarbonato de amônio 0,05 a 0,5M em pH 7,8; frações de 3,0 mL foram coletadas num fluxo de 20 mL por hora com auxílio de um coletor de frações (GILSON).

A absorbância de cada fração coletada foi lida em 280 nm em um espectrofotômetro (SPEKOL Zeiss).

3.3.2- Recromatografia da fração M1a da peçonha de *B. moojeni* em DEAE-Sephadex A-25.

41 mg da fração M1a obtida no fracionamento descrito no item 3.3.1 foram ressuspendidos em 2 mL do tampão acetato de amônio 0,05M, pH 5,5. Em seguida a amostra foi aplicada a uma coluna de troca iônica em gel de DEAE- Sephadex A-25 (40 cm x 1,0 cm) e equilibrada com o mesmo tampão. A amostra foi eluída em temperatura ambiente pelo estabelecimento de um gradiente convexo de concentração usando o tampão acetato de amônio 0,05 a 1,0M em pH 5,5; frações de 3,0 mL foram coletadas exatamente nas mesmas condições descritas para o item 3.3.1.

3.2.3- Dosagem protéica

Para quantificar as proteínas presentes nas amostras de peçonha e frações, soluções contendo de 0,1 a 2,0 mg de proteínas foram submetidas à dosagem pelo método do microbiureto, conforme descrito por ITZHAKI e GILL (1964). Utilizou-se a soroalbumina bovina para estimar a reta padrão. As amostras de proteínas foram completadas para o volume de 1,0 mL com água, aos quais foram acrescentados 500 µl dos reagentes R1 ou R2; a seguir foram feitas as leituras em espectrofotômetro a 310nm, contra um branco sem proteína. O reagente R1 é composto por 0,21% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dissolvido em NaOH a 30,4% e o R2 é formado por uma solução de NaOH a 30%.

3.2.4- Eletroforese em gel de poliacrilamida

3.2.4.1- Preparação dos géis:

Dois espaçadores em forma de fitas foram utilizados para formar entre as placas um espaço retangular de aproximadamente 0,7 mm de espessura, as placas de vidro utilizadas na preparação dos géis medem aproximadamente 9,5 cm de largura, 10,5 cm de comprimento e 0,1 cm de espessura. Com o auxílio de um suporte de montagem, as placas foram imobilizadas verticalmente, formando assim uma câmara que foi preenchida com a solução do gel.

Terminada a polimerização, a placa foi colocada em uma cuba de acrílico e conectada aos eletrodos. A eletroforese foi conduzida, estabelecendo-se os seguintes parâmetros: 20 mA, 600 volts e 30 watts, por aproximadamente 80 minutos.

Após a eletroforese, os géis foram retirados da placa e mergulhados em uma solução fixadora (metanol 50%; ácido acético 10%) por 5 minutos, sendo posteriormente corados por aproximadamente 10 minutos com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (p/v) em água – metanol – ácido acético (40:50:10 v/v) e o excesso desta solução corante foi retirado com uma solução descorante (água – etanol – ácido acético (60:30:10 v/v)). Em seguida, os géis foram prensados entre duas folhas de papel celofane poroso, em bastidores fixados por garras e deixados à temperatura ambiente por aproximadamente 2 a 3 dias para a secagem. Neste

procedimento os géis se desidratam, transformando-se numa fina película entre as folhas de celofane, que são recortadas e guardadas para posterior análise e fotografadas.

3.2.4.2- Em condições desnaturantes:

As eletroforeses para a estimativa dos pesos moleculares foram realizadas segundo o método de LAEMMLI (1970), utilizando-se géis de poliacrilamida com agentes desnaturantes na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio). Na preparação dos géis a 14%, foram utilizadas as seguintes soluções:

SOLUÇÕES ESTOQUES	VOLUME (μ L)	
	GEL DE SEPARAÇÃO	GEL DE EMPILHAMENTO
Tris-HCl 2M pH 8,8	1175	-
Tris-HCl 2M pH 6,8	-	167
EDTA 200 mM	62,5	27
Acrilamida:bis (30 : 0,8)	2920	433
Água desionizada	2015	1990
TEMED	7,5	2,5
Persulfato de amônio (10%)	37,5	18

A solução tris HCl 0,1 M, EDTA 7,8 mM, glicina 0,77 M e SDS 0,3% (p/v) pH 8,3 foi utilizada como tampão para o cátodo e a mesma solução, porém sem glicina, para o ânodo.

As amostras contendo cerca de 100 μ g de proteína foram dissolvidas em 50 μ l de água desionizada e 25 μ l de tampão STOP (Tris-HCl 187 mM pH 6,8, SDS 6%, EDTA 6 mM, azul de bromofenol 1% e glicerol 27%) e 5 μ L de β -mercaptoetanol, aquecidas por 2 minutos a 100° C, e 10 a 20 μ L de cada amostra foram aplicadas nos poços de gel.

Foi utilizado o seguinte marcador de peso molecular (Low Markers Weight): α -lactoalbumina (PM 14.400), inibidor de tripsina (PM 20.100), anidrase carbônica (PM 30.000), ovoalbumina (PM 45.000) e soroalbumina bovina (PM 66.000), fosforilase b (97.000).

3.2.4.3- Sem agentes desnaturantes em pH alcalino:

Esta eletroforese surgiu da técnica descrita por LAEMMLI (1970) e DAVIS (1964), com algumas modificações.

Na preparação dos géis a 14% foram utilizadas as seguintes soluções:

SOLUÇÕES ESTOQUES	VOLUME (μ L)
Tris HCl 2 M pH 8,8	1175
EDTA mM	63
Acrilamida-Bis (30: 0,8)	2092
Água desionizada	2015
TEMED	7,5
Persulfato de amônio (10%)	38

A solução do eletrodo foi constituída por Tris-glicina pH 8,3 (0,1 M de Tris e 0,77 M de glicina) tanto para o cátodo quanto para o ânodo.

As amostras contendo cerca de 50 μ g de proteínas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,8, contendo glicerol a 10% e azul de bromofenol a 0,1%.

O procedimento dos passos da eletroforese segue as condições citadas no item anterior.

3.2.5- Atividade Fosfolipásica

A atividade fosfolipásica A_2 foi determinada por titulação potenciométrica segundo o método descrito por DE HAAS et al (1968). Como substrato foi utilizada uma emulsão aquosa de gema de ovo (uma gema em 50 ml de água desionizada) em presença de desoxicolato de sódio e de CaCl_2 , como segue: 15 ml da emulsão aquosa da gema de ovo, 1ml de CaCl_2 0,6M e 10ml da solução de desoxicolato de sódio 0,03 M; o volume foi completado para 100 ml com água desionizada, 10 ml dessa solução foram utilizados para cada ensaio enzimático.

Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com uma solução padrão de NaOH em pH 8,0 e temperatura ambiente (28° C). A atividade fosfolipásica específica foi determinada utilizando-se 10 μg da amostra, e calculada pela quantidade de microequivalentes de base consumida por minuto, por mg de proteína.

4- RESULTADOS

4.1- Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em CM-Sepharose Fast Flow

A figura 1 mostra o perfil cromatográfico obtido no fracionamento de 200 mg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni*. As principais frações obtidas foram: MIa, MIb, MIIa, MIIb, MIII, MIV, MV, MVI e MVII. Após a liofilização e dosagem protéica estas frações foram armazenadas a -20°C . A recuperação protéica foi aproximadamente 91% (Tabela 1).

Observe que a fração MIa representou a principal fração da peçonha ($\sim 32\%$) com atividade PLA₂, enquanto MV representou somente 4,6% da peçonha total.

Tabela 1- Recuperação protéica por absorvância à 280 nm das frações obtidas no fracionamento em CM-Sepharose Fast Flow, e atividade PLA₂ específica das frações.

AMOSTRA	A 280 nm	RECUPERAÇÃO (%)	ATIVIDADE PLA ₂ ESPECÍFICA (U/ mg/ min)
PB	155,9	100	103
MIa	49,46	31,72	105
MIb	31,35	20,11	-
MIIa	9	5,83	-
MIIb	11,97	7,68	-
MIII	8,99	5,77	-
MIV	4,58	2,94	-
MV	7,22	4,63	90,92
MVI	11,98	7,68	-
MVII	7,11	4,56	-
TOTAL	141,75	90,92	

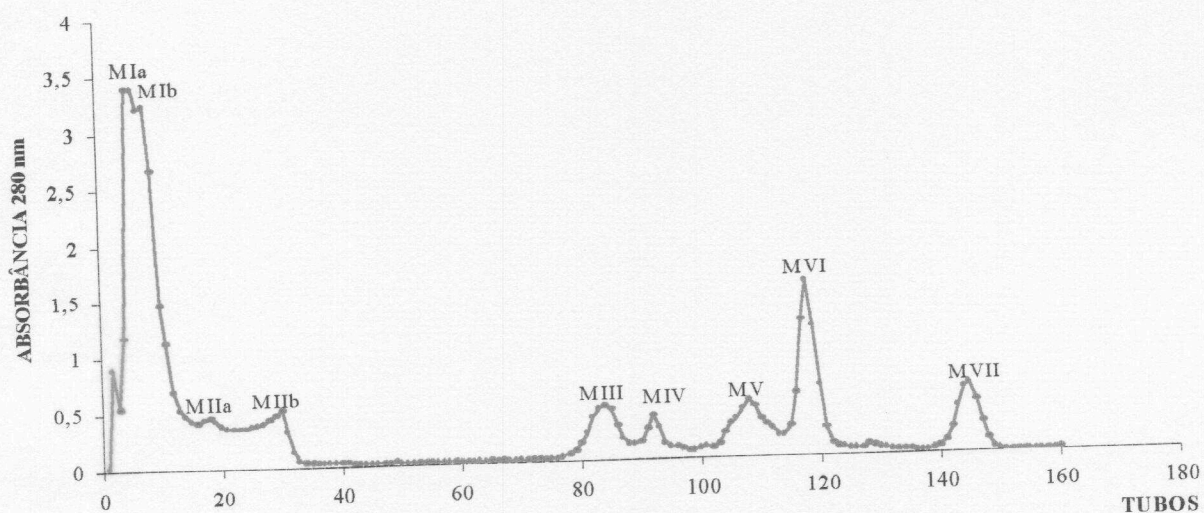


Fig. 1- Perfil cromatográfico de 200 mg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em coluna de CM-Sephacose Fast Flow (30 x 1,5 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M em pH 7,8, estabelecendo-se um gradiente convexo de concentração 0,05 a 0,5 M, a partir do 60.º tubo, com fluxo de 20 ml/hora e coletadas frações de 3,0 mL/ tubo a temperatura ambiente.

4. 2- Recromatografia da fração M Ia da peçonha de *B. moojeni* em DEAE-Sephadex A- 25.

O perfil cromatográfico obtido na recromatografia de 41 mg da fração M Ia resultou em 10 frações designadas de G1 a G10, sendo que somente as frações G5 e G6 apresentaram atividade fosfolipase.A₂ conforme a figura 2. A tabela 2 expressa os percentuais de recuperação protéica das frações.

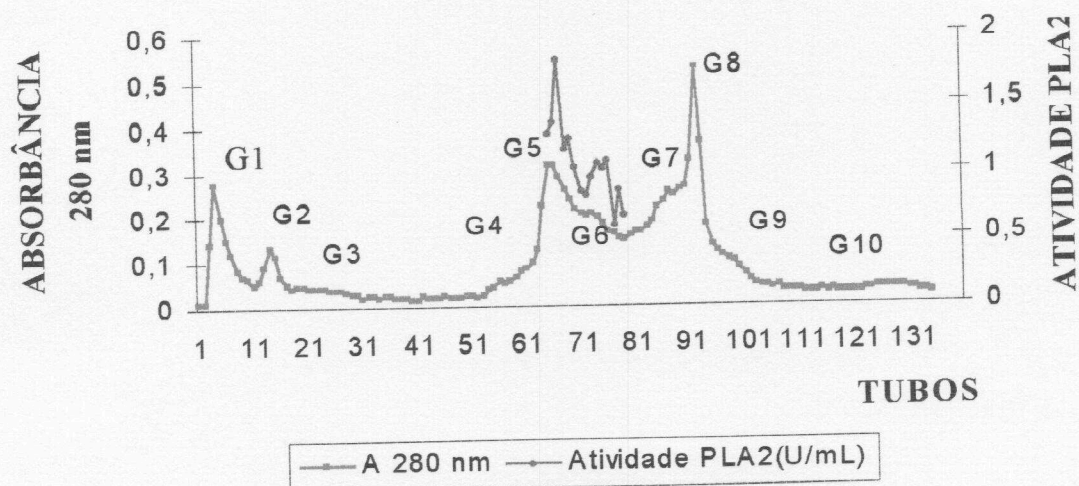


Fig. 2- Perfil cromatográfico de 41 mg de MIIa em coluna de DEAE- Sephadex A- 25 (40x1,0 cm), equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05M em pH 5,5, estabelecendo um gradiente convexo de concentração (0,05 a 1,0M), a partir do 45° tubo, com fluxo de 20 mL/hora e coletadas frações de 3,0 mL/ tubo a temperatura ambiente. A atividade fosfolipase A₂ das frações G5 e G6 foi determinada por titulação potenciométrica com emulsão aquosa de gema ovo como substrato.

G5- Tubos: 65 a 70

G6- Tubos: 71 a 79

Tabela 2- Recuperação protéica por dosagem de proteína (Método de Microbiureto) das frações obtidas em DEAE- Sephadex A- 25

AMOSTRA	mg	% recuperação
MIIa	41	100
G1	0,424	1,03
G2	0,1216	0,29
G3	0,6	1,46
G4	0,51	1,24
G5	1,04	2,53
G6	1,42	3,46
G7	2,5	6,09
G8	5,9	14,39
G9	5,8	14,14
G10	0,1	0,24
TOTAL	18,41	44,9

4. 3- Eletroforeses

4. 3. 1- Condições desnaturantes

A figura 3 mostra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%, em condições desnaturantes, da fração MIIa resultante do fracionamento da peçonha bruta de *B. moojeni* em CM- Sepharose Fast Flow e das frações G5 e G6 obtidas na recromatografia de MIIa em DEAE- Sephadex A- 25. As frações G5 e G6 (linhas 4 e 5 respectivamente) apresentaram uma banda principal com peso molecular de aproximadamente 15.000 (seta).

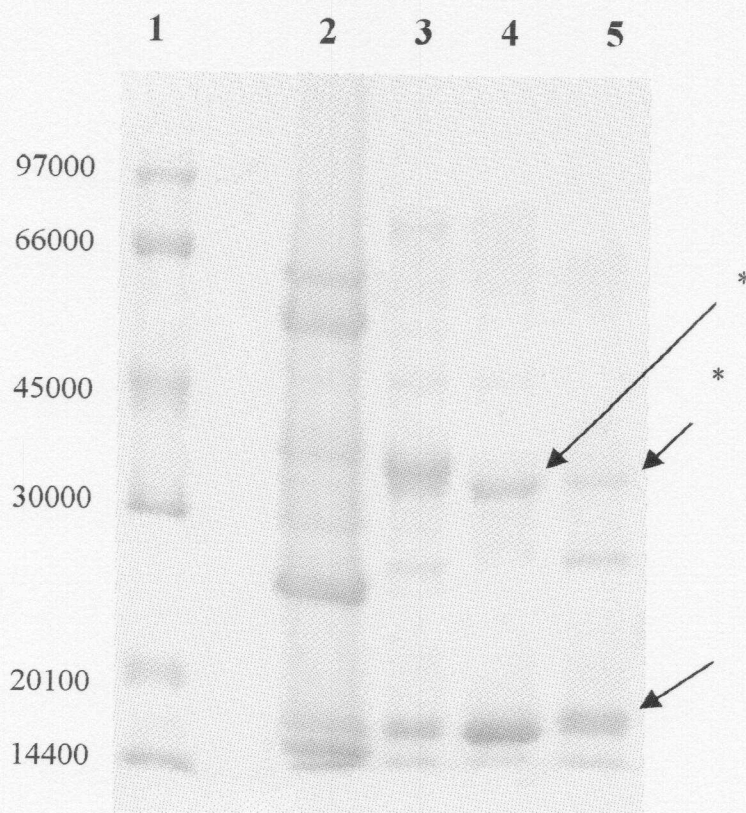


Fig. 3- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da peçonha bruta, fração M1a obtida no fracionamento em CM Sepharose Fast Flow e das frações G5 e G6 obtidas na recromatografia em DEAE- Sephadex A- 25.

Linha 1: Padrão de peso molecular: Low Mark: fosforilase b (97000), albumina (66000), ovoalbumina (45000), anidrase carbônica (30000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactoalbumina (14.400);

Linha 2: peçonha bruta de *B. moojeni*;

Linha 3: fração M1a;

Linha 4: fração G5;

Linha 5: fração G6.

4. 3. 2- Condições nativas

A figura 4 mostra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições nativas e pH alcalino. Observa-se que a banda principal da fração G5 (linha B) apresentou menor mobilidade eletroforética que a fração G6 (linha C). Para as peçonhas das serpentes irmãs (S4, S5 e S6) que apresentaram a duas PLA₂s ácidas (G5 e G6) observa-se duas bandas mais fracas e de mesma intensidade (linhas D, E e F); já as outras irmãs (S1, S2 e

S3) que possuem somente uma PLA₂ (G5), apresentaram uma única banda de maior intensidade (linhas G, H, e I).

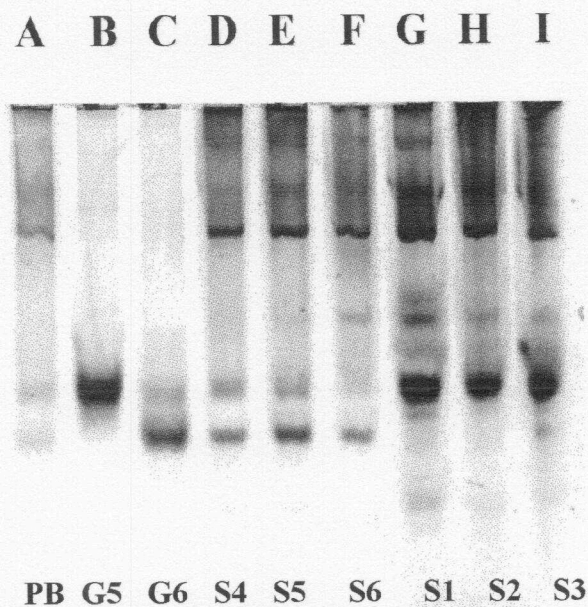


Fig. 4- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições nativas, tampão tris- glicina pH 8,3, para analisar proteínas de caráter ácido segundo LAEMMLI (1970) e DAVIS (1964), com algumas modificações.

A- peçonha bruta de *Bothrops moojeni*;

B- PLA₂ isolada da fração M1a - G5;

C- PLA₂ isolada da fração M1a - G6;

D- Peçonha da serpente irmã - S4;

E- Peçonha da serpente irmã - S5;

F- Peçonha da serpente irmã - S6;

G- Peçonha da serpente irmã - S1;

H- Peçonha da serpente irmã - S2 ;

I- Peçonha da serpente irmã - S3.

4- Atividade PLA₂

A atividade PLA₂ específica da peçonha de *B. moojeni*, das enzimas isoladas (G5 e G6) e das peçonhas individuais de *B. moojeni* irmãs determinada por titulação potenciométrica está apresentada na figura 5. A peçonha bruta e a fração M1a possuem uma atividade específica com valores semelhantes (103 e 105 U respectivamente); as frações G5 e G6 possuem uma atividade específica cerca de três vezes maior que M1a (296 e 314 U

respectivamente). As peçonhas das irmãs individuais (S1, S2 e S3) possuem uma alta atividade específica maior que M1a, enquanto que para as demais irmãs (S4, S5 e S6) esta atividade enzimática foi muito baixa. Foram realizados média de três ensaios por experimento.

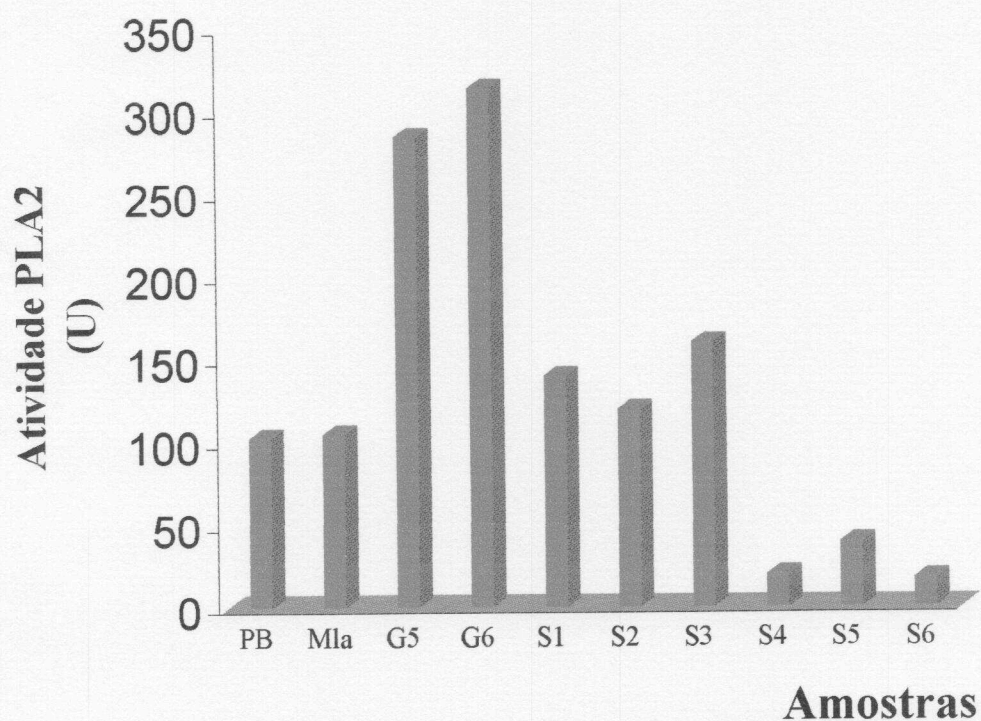


Fig. 5- Atividade fosfolipásica da peçonha bruta de *Bothrops moojeni*, das frações M1a, G5 e G6 e das peçonhas individuais de *Bothrops moojeni* irmãs (S1 a S6) sobre emulsão de gema de ovo, por titulação potenciométrica, utilizando-se 10 μ g de proteína em cada ensaio a temperatura ambiente (28° C), sendo a atividade expressa em U. Média da três ensaios por experimento.

contida nesta fração. MIA foi submetida a uma cromatografia utilizando uma resina aniônica (DEAE Sephadex A- 25), esta resina, ao contrário de CM Sepharose Fast Flow, possui grupamentos fixos carregados positivamente, capazes de separar as proteínas ácidas. Esta resina também é adequada para separar proteínas de acordo com o seu peso molecular (MANDELBAUM, 1994).

O fracionamento de MIA resultou em duas frações com atividade PLA₂ (figura 2), que foram denominadas G5 e G6 respectivamente. Estas frações não apresentaram atividade hemorrágica ou fibrinogenolítica.

Os tampões utilizados nas duas cromatografias foram o bicarbonato e o acetato de amônio, ambos são voláteis e, portanto são eliminados na liofilização, não resultando adutos às proteínas.

5- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As frações G5 e G6 apresentaram bandas majoritárias de peso molecular de aproximadamente 15000 (figura 3), que são características de PLA₂ (ARNI & WARD, 1994).

As peçonhas são produzidas por muitas espécies. Os escorpiões, as abelhas e as serpentes possuem glândulas que preparam o líquido venenoso, e possuem tubos para conduzi-lo a espinhos agudos ou dentes afiados que produzem ferimentos.

O isolamento dos componentes tóxicos presentes nas peçonhas é um instrumento útil na identificação de seus mecanismos de ação e fisiopatologia, possibilitando o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes para as vítimas de acidentes ofídicos (MOURA da SILVA et al, 1991).

A peçonha de *Bothrops moojeni* foi inicialmente cromatografada em uma resina catiônica (CM-Sepharose Fast-Flow), esta resina possui grupamentos fixos carregados negativamente, que são utilizados para separar proteínas básicas. Dentre as frações obtidas neste fracionamento (figura 1) somente MIA e MV apresentaram atividade PLA₂ (Tabela 1). A fração MIA foi inicialmente excluída não se ligando na resina, evidenciando assim o caráter ácido de suas proteínas.

Esta fração além de ter alta atividade PLA₂ específica, apresentou também atividades hemorrágica e fibrinogenolítica (dados não apresentados). A atividade hemorrágica é provocada por enzimas que possuem ação lesiva na membrana basal dos vasos capilares (MANDELBAUM, 1990). As enzimas fibrinogenolíticas podem hidrolisar as cadeias do fibrinogênio causando a incoagulabilidade sanguínea (HUANG et al, 1993).

È bem conhecido que variantes naturais ou isoformas de PLA₂ estão em peçonhas individuais de serpentes (CHIOU et al, 1991). Com o objetivo de isolar as isoformas de PLA₂

banda parece mais forte e a sua isoforma (G6) está ausente. Já para as outras peçonhas individuais (S4, S5 e S6) onde as duas isoformas estão presentes, observa-se duas bandas mais fracas e de mesma intensidade.

Analisando as peçonhas individuais de serpentes de *B. asper*, LOMONTE et al (1992), mostraram que nem todas as isoformas e miotoxinas são expressas em todos espécimes, e também existem vários tipos de padrões de expressão na população, com variação na frequência.

A proteína Bothrojaracin isolada de *B. jararaca* é constituída de duas subunidades não idênticas (15.000 e 13.000) ligadas por pontes dissulfeto. O ponto isoelétrico desta proteína varia de 4,0 a 4,2 devido à presença de várias isoformas que possuem propriedades farmacológicas semelhantes (MONTEIRO et al, 1997).

A Bothrojaracin forma um complexo não covalente com a trombina bloqueando sua atividade, com isto não há indução da agregação plaquetária e o coágulo não é formado (ZINGALI et al, 1993; AROSCAS et al, 1996). CASTRO et al (1999) demonstraram que as outras espécies de serpentes botrópicas possuem as Bothrojaracin-like, que são proteínas de peso molecular 27.000, imunologicamente relacionadas com a Bothrojaracin. Estas também inibem a agregação plaquetária via trombina. A análise desse estudo mostrou que a peçonha de *B. moojeni* pode conter uma maior proporção de uma única isoforma de Bothrojaracin-like com diferentes mobilidades eletroforéticas.

FAURE & BON (1987) identificaram cerca de 15 isoformas da crotoxina de vários grupos de peçonhas de *Crotalus durissus terrificus*. Embora relativamente grande este número era esperado já que a crotoxina é formada pela associação ao acaso das subunidades A e B, em que ambas podem ter variantes moleculares.

REICHL et al (1989) isolaram uma PLA₂ ácida da peçonha de *B. moojeni* denominada BM-PLA₂, pI 4,6, esta provavelmente é a PLA₂ contida na fração G5, visto que esta que isoforma aparece em todas irmãs. BM-PLA₂, não é tóxica, hemorrágica e edematogênica.

Recentemente, NONATO et al (2001) relataram a cristalização e estudos cristalográficos preliminares da BM-PLA₂.

Em geral, as PLA₂ ácidas não são letais ou exibem baixa letalidade em camundongos (DAVIDSON & DENNIS, 1991). DANIELE et al (1997) isolaram uma PLA₂ ácida da peçonha de *B. neuwiedi* e esta apresentou baixa letalidade e alta citotoxicidade *in vitro*. Esta citotoxicidade é dependente da atividade enzimática (DONATO et al, 1997). A citotoxicidade e a baixa letalidade podem oferecer vantagens no estudo de crescimento de tumores.

Na figura 5, observamos que as frações G5 e G6 possuem uma banda principal mais ativa com atividade PLA₂ específica semelhantes. Geralmente, as isoformas induzem atividades similares com variação na intensidade (ROWAN et al, 1985).

Observamos também, na figura 5, que as peçonhas das irmãs que possuem as duas isoformas apresentaram uma atividade PLA₂ específica menor que as peçonhas individuais que possuem somente uma isoforma (G5).

A análise destas isoformas de PLA₂ ácidas mostram claramente que existe uma variabilidade quantitativa e qualitativa na expressão destas proteínas da peçonha de *B. moojeni*.

As isoformas podem ser produtos de diferentes genes distribuídos na população ou, diferentes modificações pós-traducionais em uma única proteína (LOMONTE & CARMONA, 1992).

Estudos de clonagem da PLA₂ miotóxica de *Trimeresurus flavoviridis* mostraram a existência de seis isogênes diferentes (NAKASHIMA et al, 1993).

Na peçonha da espécie *B. asper*, as duas seqüências das miotoxinas (I e II) diferem na estrutura primária (KAIZER et al, 1990; FRANCIS et al, 1991), sendo produtos de genes distintos, provavelmente surgidos por duplicação e divergência (DAVIDSON & DENNIS, 1990; NAKASHIMA et al, 1993).

A proteína Bothrojararacin é resultado de diferentes alelos ou expressão de isogênes para ambas as subunidades (MONTEIRO et al, 1997).

Tem sido demonstrado que a origem da multiplicidade de isoformas da crotoxina resultam da combinação de diferentes modificações pós-transducionais de um único precursor da subunidade A da existência de mais de um DNA que codifica a subunidade B (FAURE & BON, 1986).

O conhecimento da variabilidade individual de peçonhas de serpentes pode permitir a descoberta de tratamentos mais eficientes para as vítimas, e seus sintomas poderão auxiliar na escolha do soro anti-peçonha mais adequado.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, C. F. S.; DA SILVA, O. A.; GODOY, P.; et al. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. **Toxicon**, 23: 877-85, 1985.
- ARNI, R. K. and WARD, R. J. Phospholipases A₂- A structural review. **Toxicon**, 34: 827-41, 1996.
- AROSCAS, V.; ZINGALI, R. B.; GUILLIN, M. C. et al. Bothrojaracin: a potent two- site- directed thrombin inhibitor. **Biochemistry**, 35: 9083-9, 1996.
- ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; ASPERTI, M. C. A. et al. Isolation of major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, 23: 691-706, 1985.
- ASSAKURA, M. T. and MANDELBAUM, F. R. Cleavage of immunoglobulins by moojeni protease a from the venom of *Bothrops moojeni*. **Toxicon**, 28: 734-6, 1990.

CHIOU, S. H., CHUANG, L. L. and CHANG, C. C. Characterization and immunological comparison of isoenzymes of phospholipases A₂ from snake venoms of different genera and families. **Biochem. Int.**, 25: 1003- 11, 1991.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V. and WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, 29: 1279- 303, 1991.

CONDREA, E.; YANG, C. C. and ROSENBERG, P. Lack correlation between the anticoagulant activity and phospholipase hydrolysis snake venom phospholipase A₂. **Thromb. Hemostasis**. 45: 82- 9, 1981.

DA SILVA, O. A.; LÓPEZ, M. and GODOY, P. Intensive care unit treatment of acute renal failure following snake bite. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 28: 401-11, 1979.

DANIELE, I. D.; BIANCO, I. D.; DELGADO, C.; et al. A new phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedii* (Yarará chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**, 35: 1205-15, 1997.

DAVIDSON, F. and DENNIS, E. A. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. **J. Mol. Evol.**, 31: 222-38, 1990.

DAVIS, B. J. Disk eletrophoresis II, method and application to serum proteins. **Ann. NY. Acad. Sci.**, 121: 404, 1964.

DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M.; NIEUWENHUIZEN, W.; et al. Purification and properties of phospholipases A from porcine pancreas. **Biochem. Biophys. Acta**, 159: 103-17, 1968.

DENNIS, E. A. The growing phospholipase A₂ superfamilie of signal transduction enzymes. **Trends Biochem. Sci.**, 22: 1- 2, 1997.

DONATO, N. J.; MARTIN, C. A.; PEREZ, M. et al. Regulation of epidermal growth factor receptor activitvity by crotoxin, a snake phospholipase A₂ toxin. A novel growth inhibitory mechanism. **Biochem. Pharmac.** 51: 1543- 43, 1997.

DuBORDIEU, D. J.; KAWABUCHI, H. and SHIER, W. T. Molecular weight variations in the diversity of phospholipase A₂ form in reptile venoms. **Toxicon**, 25: 333- 43, 1987.

FAN, C. Y.; QIAN, Y. C.; YANG, S. L.; et al. Cloning, sequence analysis and expression in *E. coli* of the cDNA of Thrombin- like enzyme (Pallabin) from the venom of *Agkistrodon halys pallas*. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 47: 217- 25, 1999.

FAURE, G. and BON, C. Several isoforms of crotoxins are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, 25: 229- 34, 1987.

FLETCHER, J. E.; RAPUANO, B. E.; CONDREA, E.; et al. Relationship between catalysis and toxicological properties of three phospholipase A₂ from elapid snake venom. **Toxic. Appl. Pharmac.**, 59: 375- 82, 1981.

FRANCIS, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. et al. Míotoxin II from *B. asper* (terciopelo) venom is a lysine- 49 phospholipase A₂. **Arch. Biochem. Biophys.**, 284: 352-9, 1991.

FREMONT, D. H.; ANDERSON, D. H.; WILSON, I. A. et al. Crystal structure of phospholipase A₂ from indian cobra reveals a trimeric association. **Proc. Natl. Acad. USA**, 90: 342- 6, 1993.

- FUKAGGAWA, T.; NOSE, T.; SHIOFASHI, Y.; et al. Purification, sequence and characterization of single aminoacid substituted phospholipase A₂ isozymes from *Trimeresurus gramineus* (Green hebu snake) venom. **Toxicon**, 31: 957- 67, 1993.
- FURTADO, F. D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, S.; et al. Comparative study of 9 *Bothrops* snakes venoms from adult females snake and their offspring. **Toxicon**, 29: 219- 26, 1991.
- GUTIÉRREZ, J. M. and LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, 33: 1405- 24, 1995.
- HOGÉ, A. R. and ROMANO, S. A. et al. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil - Serpentes, Elapidae e Viperidae. **Mem. Ins. Butantam**, 31: 109- 84, 1972.
- HOMSI- BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO- NETO, et al. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, 26: 615- 27, 1988.
- HUANG, H. C. Release of slow reacting substance from the guinea-pig lung by phospholipase A₂ of *Viperidae russelli* snake venom. **Toxicon**, 22: 359- 65, 1984.
- HUANG, R. F.; HUNG, C. C. and CHIOU, S. H. Characterization of three fibrinogenolytic proteases isolated from the venom of Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*). **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 31: 1041- 50, 1993.
- ITZHAKI, R. F. and GILL, D. M. A microbiuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem**, 9: 401- 10, 1964.

KAISER, J. I.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. et al. The aminoacid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys.** 278: 319-25, 1990.

KUDO, I.; MURAKAMI, M.; HARA, S.; et al. Mammalian non- pancreatic phospholipase A₂. **Biochem. Biophys. Acta**, 117: 217-31, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680- 5, 1970.

LI, Y; YU, B. Z.; ZHU, H.; et al. Phospholipase A₂ engineering structural and functional roles of the highly conserved active site residue aspartic- 49. **Biochemistry**, 39: 14714- 22, 1994.

LLORET, S. and MORENO, J. J. Odema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms. **Toxicon**, 31: 949- 56, 1993.

LÔBO-DE-ARAÚJO, A. RADVANYI, F. and BON, C. Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (Fear de Lance) venom: molecular and enzymatic properties. **Toxicon**, 35: 1069- 81, 1994.

LOMONTE, B. and CARMONA, E. Individual expression patterns of myotoxin isoform in the venom of snake *Bothrops asper*. **Comp. Biochem. Physiol. [B]**, 102: 325- 9, 1992.

MAGRIN, R. A. Distribuição intraespecífica de enzimas PLA₂ e miotoxinas em peçonhas de serpentes irmãs da espécie *Bothrops moojeni* (Viperidae, Crotalinae); 2000, 33p. (Monografia de Bacharelado). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia- MG.

MANDELBAUM, F. R. Snake venom hemorrhagins. *Mem. Inst. Butantan*, 52 (supl): 35-6, 1990.

MARAGANORE, J. M.; MERUTKA, G; CHO, W. et al. A group of phospholipase A₂ with lysine instead of aspartat 49. *J. Biol. Chem.* 259: 13839- 43, 1984.

MOLLIER, P.; CHWETZOFF, S. and MÉNEZ, A. A monoclonal antibody recognizing a conserved epitope in a group of phospholipase A₂. *Mol. Immunology*, 27: 7- 15, 1990.

MONTEIRO, R. Q.; CARLINI, C. R.; GUIMARAES, J. A.; et al. Distinct bothrojaracin isoform produced by individual jararaca (*Bothrops jararaca*) snake. *Toxicon*, 35: 649- 57, 1997.

MONTEIRO, R. Q.; YAMANOUYE, N.; CARLINI, C. R.; et al. Variability of bothrojaracin isoform and other venom principales in individual jararaca (*Bothrops jararaca*) snake maturated inder seasonally invariant conditions. *Toxicon*, 36: 153- 63, 1998.

MOURA DA SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G.; et al. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. *Toxicon*, 29: 713-23, 1991.

MUKHERJEE, A. B.; MIELE, L. and PATTABIRAMAN, N. Phospholipase A₂ enzymes regulation and physiological role. *Biochem. Pharmac.*, 48: 1- 10, 1994.

NAKASHIMA, K.; OGAWA, T.; ODA, N. et al. Accelerated evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom gland phospholipase A₂ isozymes. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA.* 90: 5964-8, 1993.

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; et al. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 231: 309-11, 1984.

NISHIOKA, S. A. and SILVEIRA, P. V. P. A clinical and epidemiologic study of 292 cases lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. *Am. J. Trop. Med. Hig.*, 47: 805-10, 1992.

NONATO, M. C.; GARRATI, R. C.; MASCARENHAS, Y. P. et al. Crystallization and preliminary cristallographic studies of a phospholipase A₂ from the venom of the Brazilian snake *Bothrops moojeni*. *Acta Cryst.*, 57: 599- 601, 2001.

OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M.; BORGES, M. H. et al. Purification and partial characterization of a new proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops moojeni* (caissaca). *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 47: 1069- 77, 1999.

OLIVEIRA, F. *Novas proteases da peçonha de Bothrops moojeni (caiçaca): purificação de quatro isoformas de fibrinogenases (Bthαs) e caracterização bioquímica da BthTl.* 2001 141p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília-DF.

OLIVEIRA, R. B. *Fatores epidemiológicos e clínicos associados a incoagulabilidade sanguínea no envenenamento por serpentes do gênero Bothrops.* 1999, 107p. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

POUGH, F. H.; HEISER, J. B.; McFARLAND, W. *A vida dos vertebrados.* São Paulo: Atheneu, 1993. 839p.

REICHL, A. P.; SERRANO, S. M. T.; ASSAKURA, M. T.; et al. Isolation and properties of a phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. *Mem. Inst. Butantan.* 51: 225- 37, 1989.

REICHL, A. P. and MANDELBAUM, F. R. Proteolytic specificity of moojeni protease a isolated from the venom of *Bothrops moojeni*. **Toxicon**, 31: 187- 94, 1993.

RENETSEDER, R.; BRINIE, S.; DIJKSTRA, B. W.; et al. A comparison of the crystal structural of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.**, 260: 11627- 34, 1985.

ROWAN, E. G.; HARVEY, A. L. and TAMIYA, N. Effects of two from the Australian king brown snake (*Pseudochisma australis*) on isolated nerve-muscle preparations. **Toxicon**, 23: 606, 1985.

SCHMIDT, M. E.; ABDELBAKI, Y. Z. and TU, A. T. Nephrotoxic action of rattlesnake and Sea snake venoms: an electron- microscopic study. **J. Path.**, 118: 49- 53, 1976.

SERRANO, S. M.; SAMPAIO, C. A. and MANDELBAUM, F. R. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom- II. Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP₁ and MSP₂. **Toxicon**, 31: p. 483- 92, 1993.

SHIER, W. T. A. and TROTTER, J. T. Phospholipase A₂ electrophoretic variants and their detection after polyacrilamide gel electrophoresis. **Anal. Biochem.**, 87: 604- 11, 1978.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. et al. A rapid procedure for the isolation of the lys- 49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, 36: 503- 14, 1998.

STOCKER, K. F. and BARLOW, G. H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (Bathroxobin). In: **Methods in Enzymology**, (Lorand, L., Ed.). New York: Academic Press, 45: 214, 1976.