



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

**Caracterização bioquímico-farmacológica de uma PLA₂ ácida isolada da
peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*)**

Aluno: Francis Barbosa Ferreira

Orientador: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Uberlândia-MG
2011



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

**Caracterização bioquímico-farmacológica de uma PLA₂ ácida isolada da
peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*)**

Aluno: Francis Barbosa Ferreira

Orientador: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

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

Uberlândia-MG
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F383c Ferreira, Francis Barbosa, 1981-
2011 Caracterização bioquímico-farmacológica de uma PLA₂ ácida
isolada da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (Bothrops paulo-
ensis) / Francis Barbosa Ferreira. -- 2011.
71 f. : il.

Orientador: 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. I. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1



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

**Caracterização bioquímico-farmacológica de uma PLA₂ ácida isolada da peçonha
de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*)**

ALUNO: Francis Barbosa Ferreira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^a. Dr^a. Veridiana de Melo R. Ávila (Orientador)

Examinadores:

Prof. Dr. André Lopes Fuly

Dra. Renata Santos Rodrigues

Data da Defesa: 27 / 07 / 2011

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

(Profa. Dra. Veridiana de M. R. Ávila)

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente à minha esposa, Sandra, pelo amor, companheirismo, carinho e compreensão em todos os momentos felizes e tristes passados durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Carlos e Ana Maria, pelo amor incondicional e por fazer de mim esta pessoa que sou hoje. Tenho muito orgulho de vocês, amo-lhes muito.

Agradecimentos

À minha esposa, companheira, amiga e amante Sandra, pelo carinho, paciência, compreensão e dedicação. Pelo abraço nas horas difíceis. Pelo sermão nos momentos de fraqueza. Por tudo aquilo que você representa pra mim. Te amo, muito!

Aos meus pais, Carlos e Ana Maria, pelo apoio, carinho e dedicação. Amo vocês!

À Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila pela orientação, amizade, confiança, oportunidades e ensinamentos. Muito obrigado, Veri!

Às Profas. Dras. Maria Inês Homsí Brandeburgo, pela oportunidade de estágio em seu laboratório, e Amélia Hamaguchi, pelos ensinamentos e esclarecimentos técnicos de laboratório no dia a dia.

À Dra. Renata, pelo auxílio nos experimentos e análises e pelas colaborações intermediadas por você, muito obrigado!

Ao Mário Sérgio pelo auxílio nos experimentos, principalmente nos de purificação (“Senhor das purificações”) e ensinamentos.

À Dayane, pela amizade desde os tempos de “cursinho”, pelo auxílio em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho e por nos divertir tanto no laboratório. Valeu “moranguinho”!

Aos demais colegas de laboratório: Dr. Luiz Fernando, Mirian, Letícia, Débora, David, Lino, Sarah, Isabela, Thais, Lamartine e Guilherme, pela convivência e auxílio no dia a dia do laboratório.

Aos funcionários: Tianinha, Marina, Gerson e Madson pela ajuda sempre que necessário.

À CAPES e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Sumário

Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	x
Apresentação.....	01
Capítulo 1.....	03
1.0 Fundamentação Teórica	03
1.1 Serpentes: classificação e aspectos evolutivos.....	03
1.2 Características epidemiológicas do acidente ofídico.....	15
1.3 Composição das peçonhas botrópicas e botropóicas.....	07
1.4 Fisiopatologia do envenenamento botrópico e botropóico.....	11
1.5 Estrutura e função de fosfolipase A ₂	16
1.6 Aplicações terapêuticas de toxinas de serpentes.....	19
2.0 Referências Bibliográficas.....	21
Capítulo 2.....	32
Resumo.....	32
Palavras-Chave.....	33
Abstract.....	33
Keywords.....	33
1.0 Introdução.....	34
2.0 Material e Métodos.....	36
2.1 Reagentes.....	36
2.2 Obtenção da peçonha de <i>B. pauloensis</i>	36
2.3 Obtenção e manutenção dos animais para os ensaios biológicos.....	36
2.4 Quantificação de proteínas	37
2.5 Purificação da fosfolipase A ₂ ácida da peçonha de <i>Bothropoides pauloensis</i>	37
2.6 Caracterização química.....	38
2.6.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com agente desnaturante.....	38
2.6.2 Determinação da massa molecular e ponto isoelétrico teórico.....	39
2.7 Sequenciamento N-terminal.....	39
2.8 Determinação da sequência completa do cDNA.....	40

2.8.1	Extração das glândulas veneníferas da serpente <i>Bothropoides pauloensis</i> e preparação do RNA total.....	40
2.8.2	Síntese do cDNA e amplificação por PCR.....	40
2.8.3	Construção e preparação dos oligonucleotídeos.....	41
2.8.4	Clonagem do cDNA em vetor e transformação bacteriana.....	41
2.8.5	Sequenciamento automático do cDNA.....	42
2.9	Análise Filogenética.....	42
2.10	Ensaio enzimáticos e farmacológicos.....	43
2.10.1	Atividade fosfolipásica A ₂ (PLA ₂).....	43
2.10.2	Inibição da agregação plaquetária por análise turbidimétrica.....	43
2.10.3	Atividade edematogênica.....	44
2.10.4	Atividade miotóxica analisada por dosagem de Creatina Cinase no plasma.....	45
2.11	Avaliação da ação da toxina sobre culturas de células tumorais.....	45
2.11.1	Meio de cultura celular para células tumorais.....	45
2.11.2	Linhagem de células tumorais.....	45
2.11.3	Cultura de células tumorais.....	46
2.11.4	Atividade citotóxica.....	46
2.12	Análises Estatísticas.....	47
3.0	Resultados	47
3.1	Purificação e caracterização química da PLA ₂ ácida (BpPLA ₂ -TXI) de <i>Bothropoides pauloensis</i>	47
3.2	Determinação das sequências N-terminal e cDNA da BpPLA ₂ -TXI.....	51
3.3	Análise filogenética.....	54
3.4	Ensaio enzimáticos e farmacológicos.....	55
3.4.1	Atividade PLA ₂ e inibição da agregação plaquetária.....	55
3.4.2	Atividade edematogênica.....	56
3.4.3	Atividade miotóxica.....	57
3.5	Atividade citotóxica sobre células tumorais.....	58
4.0	Discussão.....	58
5.0	Conclusão.....	64
6.0	Referências Bibliográficas.....	64
	Anexo I.....	70

Lista de Figuras

Capítulo 1:

Figura 1: <i>Bothropoides pauloensis</i>	05
Figura 2: Distribuição dos acidentes ofídicos por macro-região	06
Figura 3: Comparação do perfil proteômico de <i>Bothrops atrox</i> da Colômbia e do Brasil	09
Figura 4: Comparação entre o perfil transcriptômico e proteômico da peçonha de <i>Bothrops insularis</i>	10
Figura 5: Dano tecidual local	11
Figura 6: Local da catálise das diferentes classes de fosfolipases	15
Figura 7: Estruturas das PLA ₂ D49s resolvida por modelagem molecular e cristalografia de Raios-X	17

Capítulo 2:

Figura 1: Purificação da PLA ₂ ácida da peçonha de <i>Bothropoides pauloensis</i>	49
Figura 2: Determinação do peso molecular da BpPLA ₂ -TXI por MALDI-TOF em espectrômetro de massa	50
Figura 3: Sequência do cDNA e dedução da sequência de aminoácidos da BpPLA ₂ -TXI	51
Figura 4: Alinhamento da BpPLA ₂ -TXI com outras fosfolipases isoladas da peçonha de <i>Bothropoides pauloensis</i>	52
Figura 5: Análise comparativa da sequência primária de aminoácidos da proteína madura BpPLA ₂ -TXI	53
Figura 6: Análise filogenética molecular da sequência deduzida da BpPLA ₂ -TXI com outras sequências similares de PLA ₂	54
Figura 7: Perfil de estabilidade enzimática da BpPLA ₂ -TXI	55
Figura 8: Inibição da agregação plaquetária (plaquetas lavadas) pela BpPLA ₂ -TXI induzida por colágeno ou ADP	56

Figura 9: Indução de edema tempo-dependente em pata de camundongos foi medida após a injeção de 20 µg/50µL de peçonha bruta (PB) de <i>Bothropoides pauloensis</i> ou de BpPLA ₂ -TXI.....	57
Figura 10: Níveis de creatina cinase (CK) obtido do soro de camundongos injetados com 20 µg de PB de <i>Bothropoides pauloensis</i> , BpPLA ₂ -TXI ou BnSP-7 no músculo gastrocnêmio	58

Lista de Tabelas

Tabela 1: Recuperação protéica e recuperação da atividade enzimática da peçonha bruta e das frações de interesse	50
---	----

Apresentação

Atualmente o envenenamento ofídico constitui um problema de saúde pública, não só no Brasil, mas no mundo todo, principalmente nos países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos. As serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Bothropoides* são as maiores causadoras dos acidentes ofídicos e o quadro clínico desenvolvido pode ser muito variado, dependendo da quantidade de peçonha inoculada, da localização da picada, idade e tamanho da espécie da serpente e do tempo decorrido entre o acidente e o atendimento médico. As manifestações clínicas podem tanto ser locais quanto sistêmicas. Dentre as manifestações locais podem ocorrer edema, hiperalgesia, hemorragia e necrose. Nas sistêmicas os quadros mais importantes são as alterações na hemostasia do paciente e no sistema nervoso.

As peçonhas são misturas muito complexas com a maior parte de seus constituintes sendo proteínas tóxicas ou não e podem atuar na vítima de forma isolada ou sinérgica, potencializando ainda mais os danos causados. Várias destas proteínas já foram isoladas e caracterizadas estrutural e funcionalmente. Muitas delas apresentam um grande potencial farmacológico, podendo ser utilizadas como modelos para produção de fármacos no tratamento de várias doenças, como hipertensão, trombose, câncer, dentre outras.

Uma destas proteínas, as fosfolipases A₂ são bastante importantes, visto que elas podem induzir uma variedade de efeitos tóxicos nas vítimas de acidente ofídico e suas propriedades farmacológicas estão sendo muito estudadas. O entendimento da estrutura e função, bem como dos mecanismos de ação e dos efeitos farmacológicos destas toxinas, podem ampliar nosso conhecimento em áreas relacionadas ao tratamento das vítimas de acidentes ofídicos, ao desenvolvimento de novos fármacos para distúrbios hemostáticos e inflamatórios e, ainda, com ação bactericida e antitumoral.

Neste trabalho nós isolamos e caracterizamos química, estrutural e funcionalmente uma nova fosfolipase A₂ ácida da peçonha de *Bothropoides pauloensis*. Este estudo nos permite compreender os diversos mecanismos de ação desta classe de toxinas e, possivelmente, abrem novas perspectivas para

uma possível utilização desta proteína como modelo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos.

A apresentação deste trabalho foi realizada seguindo as normas do curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia - MG e da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT), sendo dividido em dois capítulos. O Capítulo 1 se consiste em uma Fundamentação Teórica envolvendo os aspectos gerais sobre a classificação das serpentes brasileiras e aspectos evolutivos, as características biológicas e epidemiológicas do envenenamento ofídico, a composição e diversidade das peçonhas, aplicações terapêuticas das toxinas e, em especial, das toxinas fosfolipase A₂, objeto de estudo deste trabalho. O Capítulo 2 apresenta um artigo intitulado: **“Caracterização bioquímico-farmacológica de uma PLA₂ ácida isolada da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*)”**, nos moldes do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica e da ABNT.

Capítulo 1

1.0 Fundamentação Teórica

1.1 Serpentes: classificação e aspectos evolutivos

Atualmente, as serpentes formam um grupo, juntamente com lagartos e anfisbenas, a ordem Squamata, integrando a classe Reptilia (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2011). De acordo com a Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH) as serpentes brasileiras são divididas em 10 famílias: Anomalepididae, Leptotyphlopidae, Typhlopidae, Aniliidae, Tropidophiidae, Boidae, Colubridae, Dipsadidae, Elapidae e Viperidae (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2011). No território brasileiro quatro famílias se destacam: Boidae, Colubridae, Elapidae e Viperidae.

No Brasil, a família Viperidae é constituída por 28 espécies divididas em 7 gêneros: *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Rhinocerothis*, (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2011), de acordo com a nova classificação realizada em 2009 (FENWICK *et al*, 2009).

Várias investigações sobre a origem e evolução das serpentes na América do Sul sugerem que as características morfológicas e ecológicas destas serpentes são resultantes de um processo de irradiação adaptativa ocorrida a cerca de 10 milhões de anos (WÜSTER *et al*, 2002). Essa grande diversidade dificulta, até hoje, a classificação e o estabelecimento das relações filogenéticas. As serpentes botrópicas, por exemplo, foram originalmente divididas em 8 grupos, baseados nos aspectos morfológicos (contagem de escamas, coloração, ornamentação, morfologia do hemipênis, osteologia, dentre outros), bioquímicos (eletroforese do plasma) e moleculares (sequenciamento de genes do DNA mitocondrial e nuclear) (PARKINSON *et al*, 2002; WÜSTER *et al*, 1997, 2002; CADLE, 1992; FERNANDES; ABE, 1991; PENSANTES; FERNANDES, 1989; JANEIRO-CINQUINI *et al*, 1987).

Após novos estudos morfológicos e moleculares, como análise do DNA mitocondrial, o gênero *Bothrops* foi reclassificado por Fenwick *et. al.* 2009. Neste estudo algumas serpentes antes botrópicas passaram a pertencer a um novo gênero, agora denominado ***Bothropoides*** com 11 espécies (*B. alcatraz*, *B. diporus*, *B. erythromelas*, *B. insularis*, *B. lutzi*, *B. matogrossensis*, *B. pubescens*, *B. pauloensis*, *B. neuwiedi*, *B. marmoratus* e *B. jararaca*). O gênero ***Bothrops*** agora é composto de 17 espécies (*B. andianus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. brasiliis*, *B. caribbaeus*, *B. isabelae*, *B. jararacussu*, *B. lanceolatus*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, *B. moojeni*, *B. muriciensis*, *B. osbornei*, *B. pirajai*, *B. punctatus*, *B. sanctaecrucis*, e *B. venezuelensis*).

A espécie atualmente denominada *Bothropoides pauloensis*, cuja peçonha foi objeto de estudo do presente trabalho, era descrita como *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Amaral, 1925), uma das doze subespécies do complexo *Bothrops neuwiedi* o qual era composto pelas seguintes subespécies, a saber: *B. n. bolivianus*, *B. n. diporus*, *B. n. goyazensis*, *B. n. lutz*, *B. n. matogrossensis*, *B. n. meridionalis*, *B. n. neuwiedi*, *B. n. paranaensis*, *B. n. pauloensis*, *B. n. piauhyensis*, *B. n. pubescens* e *B. n. urutu*. A subespécie *B. n. pauloensis* passou por duas reclassificações taxonômicas, onde foi denominada inicialmente como uma nova espécie *Bothrops pauloensis* (SILVA; RODRIGUES, 2008). Posteriormente, Fenwick *et al* (2009) realizaram uma revisão taxonômica baseada em evidências moleculares e morfológicas e alteraram o nome de várias espécies, sendo que a espécie *Bothrops pauloensis* passou a ser denominada *Bothropoides pauloensis*. Essa nova nomenclatura vem sendo utilizada por diferentes trabalhos citados na literatura e será a partir de agora adotada nessa revisão.

A espécie *Bothropoides pauloensis* pode ser encontrada na região central do Brasil nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e São Paulo, como mostra a **Figura 1**.

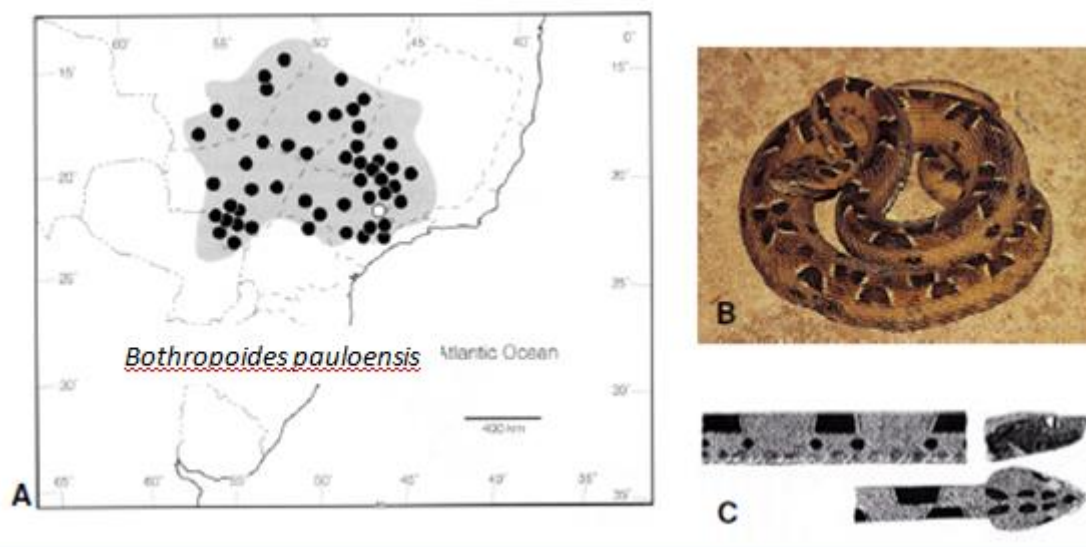


Figura 1: *Bothropoides pauloensis*. **A** – Distribuição geográfica (SILVA, 2004); **B** – Foto de exemplar (CAMPBELL; LAMAR, 2004). **C** – Padrão de manchas da espécie (SILVA, 2004; SILVA; RODRIGUES, 2008). Figura retirada da dissertação de mestrado de Thais Machado (MACHADO, 2010).

1.2 Características epidemiológicas do acidente ofídico

O envenenamento ofídico é um problema de saúde pública sendo considerado como uma das doenças negligenciadas (GUTIERREZ *et al*, 2006). O número de acidentes ofídicos é de aproximadamente 420 mil casos registrados por ano em todo o mundo, com um índice de mortalidade de aproximadamente 4,7% (19.800 casos). Porém, há uma estimativa de que estes números cheguem a aproximadamente 1.8 milhões de acidentes ofídicos levando a 93 mil óbitos por ano (KASTURITATNE *et al*, 2008).

No Brasil o número de notificações de ofidismo vem crescendo anualmente. Até o ano de 2005 foram registrados 28.597 acidentes, desde então, houve uma leve redução no número de acidentes até o ano de 2008, quando o número de casos foi de 26.905, correspondendo à incidência de 13,8 casos a cada 100 mil habitantes, dos quais 73,5% foram causados por serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Bothropoides* e 7,5% do gênero *Crotalus*. A mortalidade, em geral, é baixa (0,4%), porém, essa mortalidade pode se elevar dependendo do tipo de envenenamento e do tempo decorrido entre o acidente e o atendimento,

como no envenenamento crotálico, cujo atendimento demora de 6 a 12 horas após o acidente, elevando o índice de mortalidade para 4,7% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

O número de casos de ofidismo no Brasil varia de acordo com a região (mais elevados nas regiões norte e nordeste) e com as épocas do ano, em que aumentam os acidentes com o aumento das chuvas e da temperatura, coincidentes com o período de maior atividade humana no campo. Os acidentes acometem com maior frequência com adultos jovens e do sexo masculino. Nas regiões Sul e Sudeste, os acidentes ocorrem em maior quantidade no período de janeiro a abril. Já nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, esta variação não é tão evidente, como mostra a **Figura 2** (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

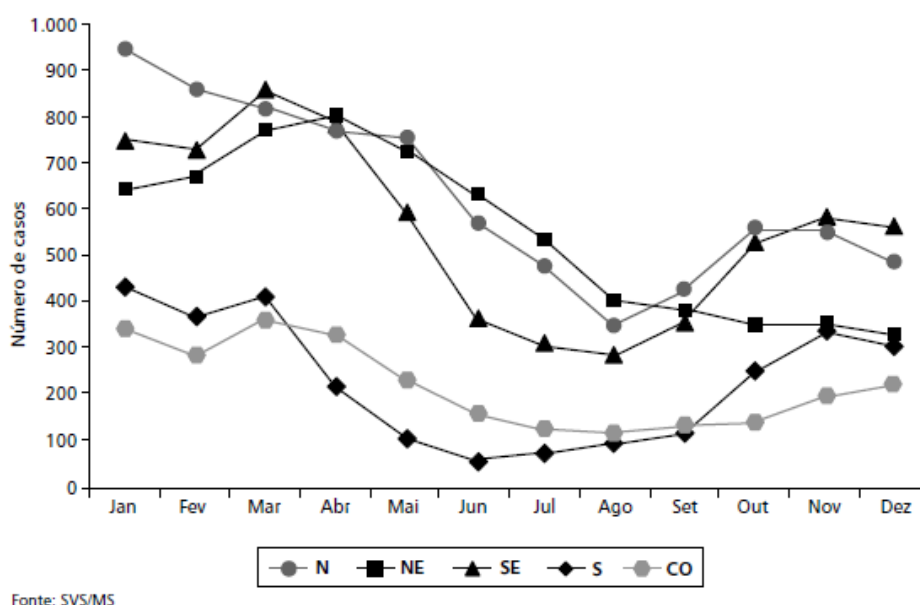


Figura 2: Distribuição dos acidentes ofídicos por macro-região. BRASIL, 2008. Fonte: Guia de Vigilância Epidemiológica (Ministério da Saúde, 2008).

Na região do Triângulo Mineiro, de acordo com Silva *et al.* (2003), foram registrados e tratados pelo Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), entre os anos de 1993 e 1995, 92 pacientes vítimas de acidentes ofídicos causados por serpentes da família Viperidae, sendo que 90 destas eram da subfamília Crotalinae, gêneros *Crotalus* e *Bothrops*.

1.3 Composição das peçonhas botrópicas e botropóicas

As peçonhas botrópicas e botropóicas são produzidas nas glândulas veneníferas que são um tipo de especialização de glândulas salivares (Kochva *et al*, 1987). Estas são extremamente complexas contendo várias substâncias farmacologicamente ativas que atuam na indução das alterações fisiopatológicas decorrentes do envenenamento. Aproximadamente 90% dos constituintes da peçonha são proteínas tóxicas ou não tóxicas. Também estão presentes citrato, íons metálicos, carboidratos, nucleotídeos em especial as flavinas mononucleotídeo dinucleotídeo que são responsáveis pela cor amarela das peçonhas e em menor proporção aminoácidos livres e lipídeos (SOUZA *et al*, 2001; FREITAS *et al*, 1992).

Nesta variedade de toxinas, podemos encontrar metaloproteinases, serinoproteinases, desintegrinas, miotoxinas, fosfolipases A₂, L-amino oxidases, fosfomonoesterases, fosfodiesterases, acetilcolinesterase, arginina esterase, hialuronidase, 5'- nucleotidase e NAD-nucleosidase, dentre outras (GUTIÉRREZ *et al*, 2009; QUEIROZ *et al*, 2008; STOCKER, 1990; TU, 1988).

A composição da peçonha pode variar de acordo com alguns fatores incluindo origem geográfica, idade e sexo da serpente, estação do ano e tipo de presa. Alguns trabalhos demonstraram a variação na composição das peçonhas de mesmas espécies de acordo com a variação geográfica (RODRIGUES *et al*, 1998; NUÑES *et al*, 2009). Foi verificado que a composição da peçonha de *Bothrops atrox*, obtidas de regiões diferentes (Colômbia e Brasil) é diferente, principalmente em relação à composição de metaloproteinases e fosfolipases A₂, como pode ser observado na **Figura 3A**.

Outros trabalhos têm evidenciado a variação na composição das peçonhas de acordo com a idade dos espécimes (ANTUNES *et al*, 2010). Neste trabalho foi demonstrado que as peçonhas de *Bothrops jararaca* filhotes (Newborn) e adultos, apresentam uma importante variação intra-específica da composição da peçonha, bem como uma variação das atividades biológicas e imunológicas destas peçonhas (**Figura 3B**). A variação da composição das peçonhas também ocorre interespecificamente, como foi mostrado por Queiroz *et al* (2008). Os autores analisaram peçonhas de várias espécies botrópicas e

concluíram que existem diferenças entre estas, o que pode refletir nas diferentes atividades biológicas produzidas pelas mesmas (**Figura 3C**).

Vários trabalhos têm sido realizados no sentido de entender melhor a composição das peçonhas das serpentes como análise de proteomas e de transcriptomas. Gutiérrez *et al* (2009) realizaram a análise proteômica da peçonha de *B. asper*, observando variação na composição da peçonha de serpentes de regiões diferentes. Terra *et al* (2009) compararam a proteômica das peçonhas de *Bothrops jararaca* e *Bothrops lanceolatus*, avaliando as diferenças na composição, principalmente, de metaloproteínases nestas duas peçonhas. As análises transcriptômicas de algumas peçonhas mostraram o perfil de expressão gênica. Kashima *et al* (2004) e Neiva *et al* (2009) realizaram a análise transcriptômica das glândulas de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops atrox*, respectivamente, contribuindo para o conhecimento da diversidade genética presente nas glândulas das serpentes deste gênero. Uma das maiores causadoras de acidentes ofídicos no Brasil, a serpente *Bothrops jararaca* teve seu transcriptoma analisado por Cidade *et al* (2006) e os resultados podem ajudar no entendimento dos efeitos tóxicos do envenenamento, bem como nos estudos proteômicos subsequentes a este trabalho. A combinação da análise de transcriptoma e proteômica das peçonhas revela parte da composição protéica e peptídica das mesmas e ainda traz novos conhecimentos sobre modificações pós-traducionais ocorridas nas glândulas de peçonha (VALENTE *et al*, 2009). Valente *et al* (2009) realizaram a análise transcriptômica e proteômica da peçonha de *Bothrops insularis*, e verificaram que há uma diferença entre o transcriptoma e o proteoma, tanto na quantidade de certas toxinas quanto na estrutura, sugerindo que algumas proteínas possuem maior importância que outras na evolução desta espécie, por isso são mais expressas que outras, e algumas modificações nas estruturas destas proteínas ocorrem após a tradução de seus genes (**Figura 4**).

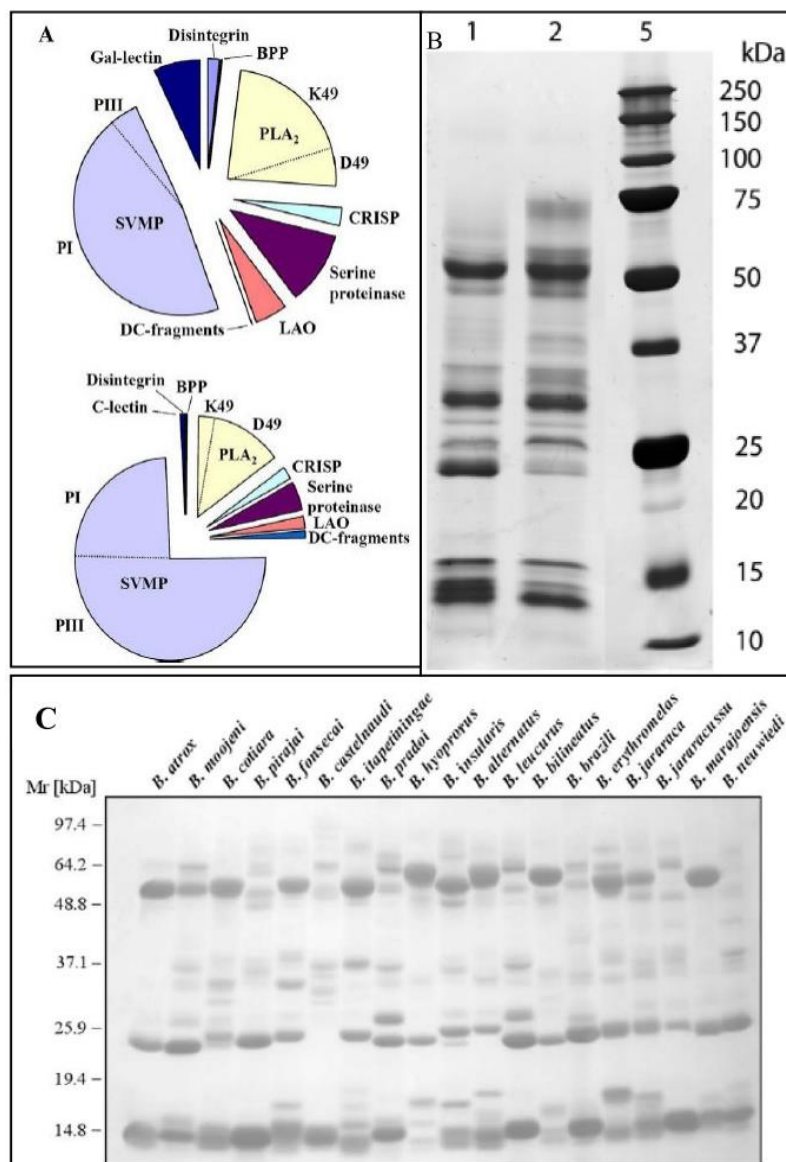


Figura 3: **A)** Comparação do perfil proteômico de *Bothrops atrox* da Colômbia (acima) e do Brasil (abaixo) (NUÑES *et al*, 2009); **B)** perfil protéico da peçonha de *Bothrops jararaca*: 1 – Adulto, 2 – Jovem (Newborn), 5 – Padrão de peso molecular, em PAGE-SDS em condições reduzidas (ANTUNES *et al*, 2010); **C)** perfil protéico de diferentes espécies botrópicas em PAGE-SDS (QUEIROZ *et al*, 2008).

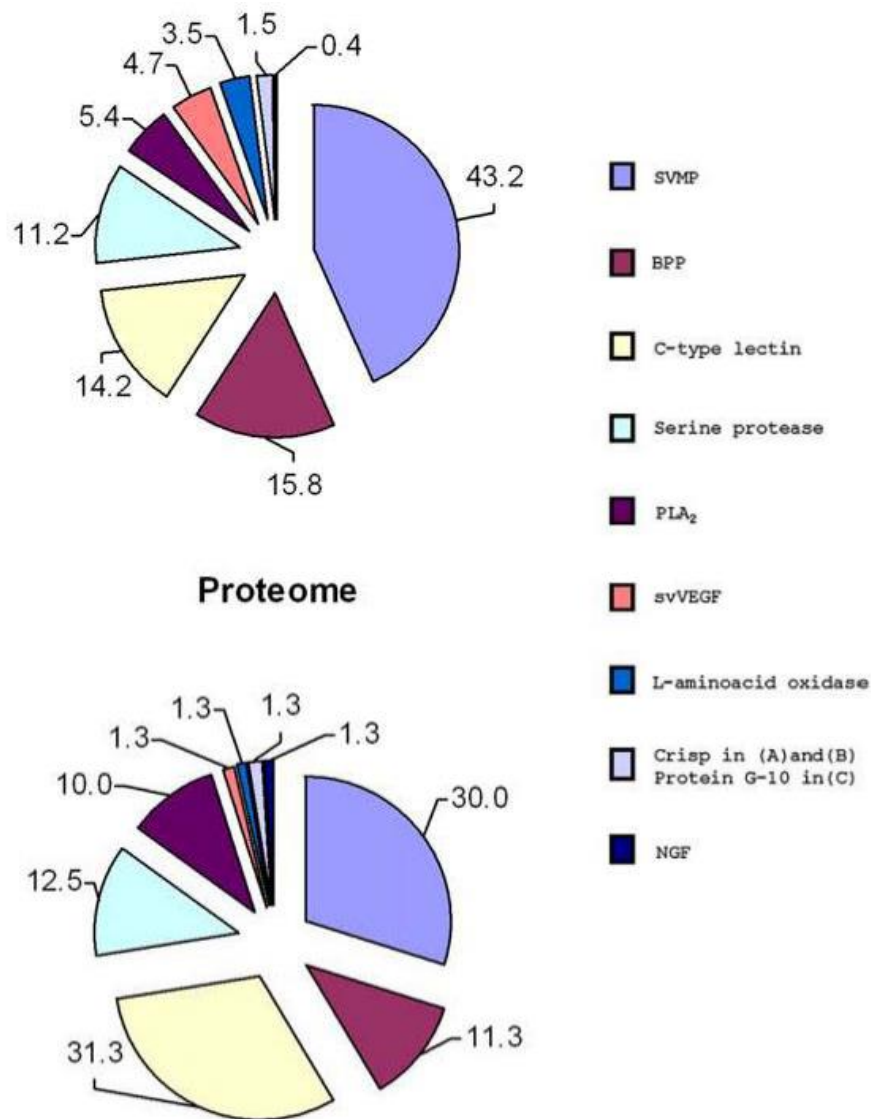


Figura 4: Comparação entre o perfil transcriptômico e proteômico da peçonha de *Bothrops insularis* (VALENTE *et al*, 2009). Legenda: SVMP (Snake Venom Metallo Proteases; BPP: Bradykinin-potentiating Peptide; PLA₂: Phospholipase A₂; svVEGF: snake venom Vascular Endothelial Grow Factor; NGF: Neurotrophic Growth Factor.

O conhecimento da composição protéica dessas peçonhas tem uma importância significativa, pois podem auxiliar também no aspecto terapêutico específico ligado a acidentes ofídicos. O estudo da proteômica das peçonhas pode trazer um conhecimento maior sobre quais toxinas são mais importantes para determinadas espécies e, com isso, aperfeiçoar a produção dos soros antivenenos. Vários autores estão utilizando a venômica em conjunto com a

antivenômica (identificação de epítomos contidos nas proteínas das peçonhas reconhecidos pelo soro antiveneno por técnicas de proteômica) na tentativa de um melhor direcionamento na fabricação dos soros antivenenos melhorando a eficiência destes e reduzindo os efeitos colaterais (CALVETE *et al*, 2009; GUTIÉRREZ *et al*, 2009).

1.4 Fisiopatologia do envenenamento botrópico e botropóico:

As peçonhas botrópicas e botropóicas provocam tanto danos teciduais no local de inoculação da peçonha como distúrbios sistêmicos. A lesão tecidual é um dos principais problemas induzidos pelas peçonhas botrópica e botropóica (GUTIERREZ *et al*, 2010; GUTIERREZ *et al*, 2009b; OLIVEIRA *et al*, 2009; RODRIGUES *et al*, 2007; RODRIGUES *et al*, 1998). O dano tecidual local é caracterizado por edema acentuado e progressivo, dor intensa e manifestações hemorrágicas percebidas com sangramento no local da picada, sendo que o quadro pode evoluir para necrose severa (**Figura 5**) (WARRELL *et al*, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). As complicações que se seguem após o envenenamento podem levar ao surgimento de bolhas, gangrena, abscesso, síndrome compartimental, insuficiência renal aguda e choque.



Figura 5: Dano tecidual local evidenciando edema, bolhas, equimose e necrose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A lesão tecidual pode ser causada por várias toxinas distintas ou pela ação destas em sinergia, e, dependendo do caso, o dano tecidual se torna tão intenso, algumas vezes irreversível, podendo levar à isquemia e até amputação do membro afetado (SILVEIRA; NISHIOKA, 1992). As fosfolipase A₂ miotóxicas induzem a mionecrose através de uma perturbação do sarcolema, levando a um influxo de íons cálcio e à necrose muscular (GUTIERREZ; OWNBY, 2003). As metaloproteinases também desempenham um importante papel no dano tecidual através da indução indireta da mionecrose pela isquemia (GUTIERREZ *et al*, 2009b). Estas toxinas degradam proteínas da lâmina basal de vasos sanguíneos levando a um extravasamento de sangue nestas regiões, com consequente déficit sanguíneo para a musculatura.

O edema tecidual, um dos principais problemas do envenenamento botrópico/botropóico pode ser multifatorial, ocorrendo danos em microvasos (capilares e vênulas) por metaloproteinases hemorrágicas, com consequente extravasamento e formação do edema (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009b). Além disso, mediadores inflamatórios liberados ou sintetizados após o envenenamento podem levar ao edema, assim como à hiperalgesia (GUTIERREZ; LOMONTE, 2003). As PLA₂ desempenham um importante papel nesse quadro, pois estas toxinas induzem a degranulação dos mastócitos, com a liberação de histaminas, e a produção de prostaglandinas, mediadores da formação do edema local (TEIXEIRA *et al*, 2003).

As manifestações sistêmicas são caracterizadas por alterações na coagulação sanguínea, mialgia, anúria, oligúria (podendo levar à insuficiência renal), hipotensão, hipotermia e cefaléia (ALBUQUERQUE *et al*, 2004), além de hemorragias (gengivorragia e em outras cavidades do corpo) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Alterações na hemostasia, a qual funciona sob um delicado balanço entre o processo de formação do coagulo até sua completa dissolução (fibrinólise), mantidos em equilíbrio pelas propriedades hemodinâmicas do sangue (BRAUD *et al*, 2000), são um dos principais efeitos sistêmicos induzidos pelo envenenamento botrópico/botropóico.

Algumas toxinas presentes nas peçonhas botrópicas/botropóicas atuam diretamente sobre este sistema hemostático, inibindo ou estimulando-o. Estas

toxinas podem ser agrupadas como: 1) procoagulantes: ativadores de fatores V, X, IX e protrombina, além de proteases com ação semelhante à trombina, “thrombin-like”; 2) anticoagulantes: ativadores de Proteína C, proteínas que ativam a formação do complexo fator IX/X, inibidores de trombina e PLA₂; 3) Fibrino(geno)líticas: proteínas que degradam fibrinogênio e/ou fibrina e proteínas ativadoras de plasminogênio; 4) hemorraginas: proteínas que interagem com a parede dos vasos; 5) inibidor ou ativador de plaquetas; 6) inibidores de serinoproteinases (SERPININAS) (WHITE, 2005).

A alteração na hemostasia do paciente após o envenenamento ofídico pode ser induzido por enzimas proteolíticas, geralmente classificadas de acordo com suas estruturas e funções em metaloproteinases e serinoproteinases.

Metaloproteinases de peçonha de serpentes (SVMPs) têm sido extensivamente estudadas e consideradas fundamentais no desenvolvimento de patologias induzidas pelas peçonhas. Em geral, a ação das SVMPs está relacionada à proteólise dos componentes da matriz extracelular (colágeno tipo IV, laminina, fibronectina e nidogênio), proteínas do plasma (fibrinogênio, fator de von Willenbrand, protrombina) e proteínas da superfície celular (integrinas e caderinas). Além disso, SVMPs são capazes também de interagir com receptores das plaquetas, de células endoteliais e fibroblastos, ativando ou inibindo a resposta celular. Estes efeitos promovem alterações patológicas severas, observadas após o envenenamento, tais como hemorragia, inibição da agregação plaquetária, coagulopatia, mionecrose e resposta inflamatória (MOURA DA SILVA *et al.*, 2007; WHITE, 2005). SVMPs são classificadas em quatro classes de acordo com a presença ou ausência de seus múltiplos domínios estruturais, de PI a PIV (BJARNASON; FOX, 1994). Porém, Fox e Serrano (2008) propuseram uma nova classificação para as SVMPs, baseando-se em análises proteômicas e transcriptômicas, onde novas subclasses das classes PII e PIII foram geradas e a classe PIV foi incluída na classe PIII. As SVMPs da classe PI contêm apenas o domínio metaloproteinase na sua forma madura. A classe PII é formada por SVMPs que possuem além do domínio metaloproteinase, o domínio desintegrina. As SVMPs da classe PIII possuem os domínios metaloproteinase, semelhante à desintegrina (disintegrin-like) e rico em cisteína (cysteine-rich). As PIII SVMPs ainda são divididas em PIIIa, PIIIb (processamento proteolítico), PIIIc

(homodiméricas) e PIId, as quais possuem, além dos domínios metaloproteinase, semelhante à desintegrina e rico em cisteína, o domínio semelhante à lectina tipo-C (*C-type lectin-like*).

As metaloproteinases podem atuar em diferentes mecanismos do sistema hemostático, como proteínas da membrana basal, proteínas coagulantes, plaquetas e proteínas da matriz extracelular (LAING; MOURA-DA-SILVA, 2005; TANJONI *et al*, 2010). Essas proteases são dependentes de íons metálicos para exercerem suas atividades e, a maior parte destas enzimas, são altamente tóxicas.

As serinoproteinases causam desordens hemostáticas interferindo em pontos distintos da coagulação sanguínea por degradação proteolítica, inibindo ou ativando fatores específicos envolvidos na cascata de coagulação, agregação plaquetária e fibrinólise (BRAUD *et al*, 2000). Algumas serinoproteinases possuem ação semelhante à trombina, por isso são chamadas “*thrombin-like*”. A maioria destas enzimas atuam sobre uma das cadeias do fibrinogênio A α ou B β , podendo atuar em ambas, liberando fibrinopeptídeos A, B ou AB (COSTA *et al*, 2009; MARKLAND, 1998), além de monômeros de fibrina, os quais se agrupam formando um coágulo frouxo. Como a maioria das “*thrombin-like*” não possui a capacidade de ativar o fator XIII, o qual é responsável pela estabilização do coágulo, este é facilmente removido da circulação sanguínea (STOCKER *et al*, 1982). Com isso há uma rápida diminuição do estoque de fibrinogênio *in vivo*, levando a um efeito anticoagulante e desfibrinogenante, porém *in vitro*, estas enzimas são pró-coagulantes (COSTA *et al*, 2010; MARKLAND, 1998).

Um componente importante da peçonha botrópica/botropóica, é a toxina fosfolipase A₂ (PLA₂) (E. C. 3. 1. 1. 4.), que tem como substrato os fosfolípidos que são constituintes da membrana plasmática celular. As enzimas fosfolipases A₂ (PLA₂) de peçonhas de serpentes vêm sendo amplamente estudadas devido à variedade de seus efeitos farmacológicos, como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, citotoxicidade, ativação e/ou inibição da agregação plaquetária, anticoagulação, edema, convulsão, hipotensão, dentre outras, porém, nem todas as PLA₂ induzem todos esses efeitos (FRANCISCHETTI *et al*, 1998; KINI, 2003; MASUDA *et al*, 2005).

As PLA₂ enzimaticamente ativas catalisam a hidrólise especificamente na ligação 2-acil éster de fosfolipídios, liberando como produtos os lisofosfolipídios e ácidos graxos livres (**Figura 6**) (SIX; DENNIS, 2000). Um destes ácidos pode ser o araquidônico, que é precursor de eicosanóides, como as prostaglandinas e hormônios, potentes mediadores da resposta inflamatória, além de poder funcionar como segundo mensageiro (DESSEN, 2000; DENNIS, 1997). Os lisofosfatídeos liberados podem ser convertidos em fator de ativação plaquetária (PAF).

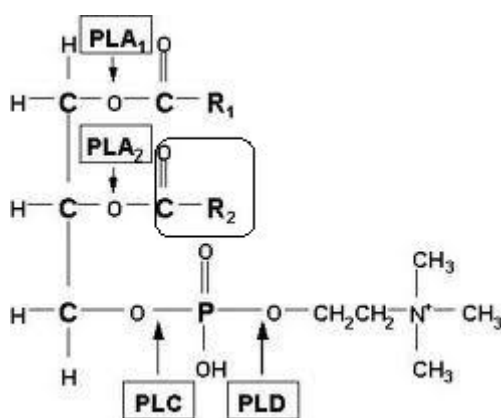


Figura 6: Local da catálise das diferentes classes de fosfolipases: fosfolipase A₁, A₂, C e D. Em destaque o sítio de catálise das fosfolipases A₂, liberando um ácido graxo livre (o qual pode ser o ácido araquidônico).

As fosfolipases A₂ podem ser divididas em cinco grupos principais: PLA₂ secretórias (sPLA₂), citosólicas (cPLA₂), Ca²⁺ independentes, acetilhidrolases fator de agregação plaquetária (PAF-AH) e as lisossômicas, divididas de acordo com o mecanismo catalítico e suas características funcionais e estruturais.

As PLA₂ secretórias foram subdivididas em quatorze grupos, de acordo com o número de resíduos de aminoácidos e posição das ligações dissulfeto, sendo que as PLA₂s das peçonhas de serpentes estão incluídas nos grupos I e II (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). Essas enzimas são pequenas, com o peso molecular variando de 13 a 18 kDa, e causam danos sistêmicos e locais pela interferência nos processos fisiológicos normais da vítima (KINI, 2003).

1.5 Estrutura e função de fosfolipases A₂

Várias PLA₂s de peçonhas de serpentes já foram isoladas e caracterizadas funcional e estruturalmente, inclusive a estrutura tridimensional de algumas destas toxinas já foi determinada por técnicas de modelagem molecular e cristalografia de raio-X (KETELHUT *et al*, 2003; MAGRO *et al*, 2003). A análise das estruturas primárias associadas à resolução das estruturas terciárias ampliou o conhecimento das bases moleculares do mecanismo de ação e possibilitou a sugestão e predição de algumas atividades farmacológicas destas toxinas.

As PLA₂s possuem sete pontes dissulfeto nas posições 11-77, 27-124, 29-45, 44-105, 51-96, 61-91 e 84-98 (HARRIS, 1991). Além disso, estas toxinas são altamente conservadas na região do sítio catalítico (-CCxxHDxC-) 44-51 e na região do “loop” ligante de cálcio (-W/YGGxG) (SCOTT *et al*, 1990).

Estas enzimas podem possuir um resíduo de aspartato na posição 49 (D49), ou um resíduo de lisina na mesma posição (K49). As D49 são enzimaticamente ativas e as K49 possuem baixa ou nenhuma atividade enzimática (OWNBY *et al.*, 1999; KETELHUT *et al.*, 2003). Existem variantes da subclasse Lys49, como Arg 49 e Ser 49 presentes em algumas PLA₂s de peçonhas ofídicas já isoladas. CHIJIWA *et al* (2006) isolaram duas PLA₂s da peçonha de *Protobothrops elegans* que possuem um resíduo de Arg na posição 49 (Arg49), denominadas PeBP(R)-I e PeBP(R)-II, mas com alto grau de homologia com as K49 já isoladas. A atividade enzimática e/ou toxicidade destas enzimas podem ser influenciadas por alguns fatores como a especificidade pelo substrato, a presença de diferentes classes de fosfolipídios na região do sítio catalítico e o poder de penetração, em que uma PLA₂ com maior penetração causa um dano mais significativo nos tecidos (KINI, 2003).

O sítio ativo da molécula de PLA₂ é uma cavidade semicircular e consiste em quatro resíduos de aminoácidos: His48, Asp49, Tyr52 e Asp99 (**Figuras 7A e B**). Uma molécula conservada de água desempenha um importante papel na catálise e está conectada nas cadeias laterais dos resíduos His48 e Asp49 através de pontes de hidrogênio (Figura 7B) (KANG *et al*, 2011). As PLA₂ D49 requerem cálcio para estabilização do sítio catalítico e, conseqüentemente, para manutenção de sua atividade enzimática (ANDRIÃO-ESCARSO *et al*, 2000;

TEIXEIRA *et al*, 2011) (**Figura 7C**). Este sítio de ligação do cálcio é formado pelo grupo β -carboxílico do Asp-49, pelos grupos carbonílicos dos resíduos Tyr-28 e Gly-33 (FLEER *et al*, 1981; MAGRO *et al*, 2003). Teixeira *et al* (2011) mostraram que a substituição do cálcio por outros íons divalentes como Fe^{++} , Mg^{++} e Zn^{++} produzem uma significativa redução da atividade destas toxinas.

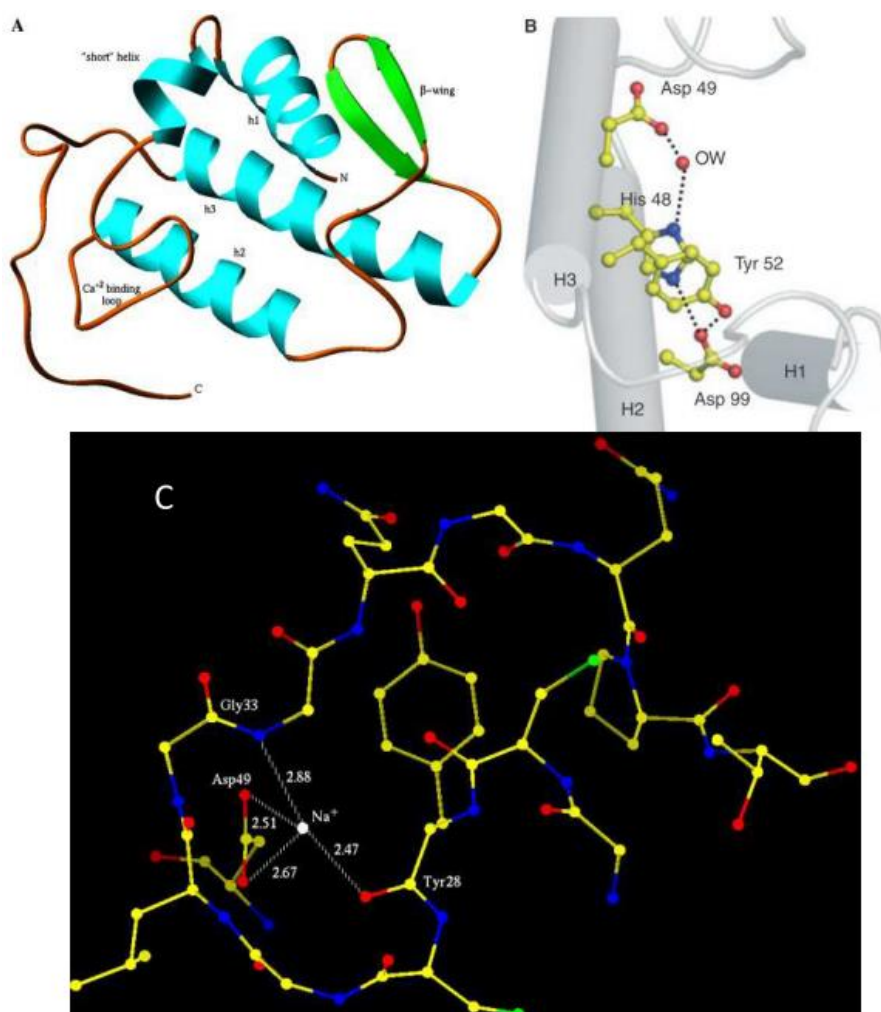


Figura 7: Estruturas das PLA₂ D49s resolvida por modelagem molecular e cristalografia de Raios-X. **A)** Estrutura da PLA₂ D49 mostrando as folhas α e β , além das regiões N-terminal e C-terminal e do loop-catalítico com sítio de ligação do Ca^{2+} (KANG *et al*, 2011) ; **B)** Estrutura do sítio catalítico com os resíduos His48, Asp49, Tyr52 e Asp99, coordenando a ligação com a molécula de água (OW) (KANG *et al*, 2011); **C)** Estrutura da PLA₂ mostrando o sítio de ligação ao Ca^{2+} (o íon cálcio está substituído pelo íon sódio visto que a proteína foi cristalizada na presença de acetato de sódio (MAGRO *et al*, 2004).

Outro resíduo de aminoácido que possui papel muito importante para as atividades miotóxicas, citotóxicas e edematogênicas das PLA₂ é o His-48. Vários autores mostraram que uma modificação deste resíduo por BPB (*p*-bromophenacyl bromide) leva à perda ou uma diminuição significativa destas atividades (ANDRIÃO-ESCARSO *et al*, 2000; RODRIGUES *et al*, 2004; CUNHA *et al*, 2011).

As fosfolipases isoladas de peçonhas de serpentes também podem ser denominadas ácidas (DENEGRÍ *et al*, 2010) ou básicas (RODRIGUES *et al*, 2004). Em grande maioria as enzimas Asp49 são ácidas e as Lys49 são básicas. Porém a posição ou a mudança de um resíduo de aminoácido de aspártico e lisina não são determinantes para tal fator. O que as tornam ácidas ou básicas é a sua composição em aminoácidos.

As PLA₂ exibem uma variedade de efeitos tóxicos e farmacológicos. Várias destas toxinas já foram isoladas e caracterizadas, e dentre seus efeitos mais comuns estão: miotoxicidade e edema (CUNHA *et al*, 2011; RODRIGUES *et al*, 2007). Estas toxinas ainda podem induzir ou inibir a agregação plaquetária (SANTOS-FILHO *et al*, 2008; RODRIGUES *et al*, 2007; FULY *et al*, 1997), neurotoxicidade (FERNÁNDEZ *et al*, 2010), efeito hipotensor (ANDRIÃO-ESCARSO *et al*, 2002), bactericida (SAMY *et al*, 2008) e citotoxicidade (STÁBELI *et al*, 2006). Vários autores dedicam seus esforços no sentido de elucidar o mecanismo de ação das fosfolipases A₂ sobre certas linhagens tumorais. Lomonte *et al* (1994) propuseram que a região determinante para a atividade citotóxica destas toxinas era a C-terminal, independente do sítio catalítico da proteína. Desde então, vários autores conseguiram, com sucesso, sintetizar quimicamente ou expressar esta região peptídica e mostrar boa atividade antitumoral sobre várias linhagens celulares (GEBRIM *et al*, 2009; ARAYA; LOMONTE, 2007; LOMONTE *et al*, 2010).

Já foram purificadas e caracterizadas cinco fosfolipases A₂ a partir da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops neuwiedi pauloensis*). Todas possuem atividade miotóxica, sendo que quatro destas proteínas são básicas, sendo que duas possuem um resíduo de Asp na posição 49 (RODRIGUES *et al*, 2004), chamadas BnpTX-I e II, e as outras duas possuem um resíduo de Lys na mesma posição (RODRIGUES *et al*, 1998), chamadas BnSP-6 e BnSP-7. Uma

PLA₂ isolada e caracterizada por RODRIGUES *et al* (2007), foi a única PLA₂ ácida isolada desta peçonha até o momento e possui um resíduo de Asp na posição 49, chamada Bp-PLA₂. As toxinas BnpTXI e II causam edema e a ruptura de lipossomos. A BnpTXI ainda possui uma alta atividade anticoagulante e bactericida, além de induzir um bloqueio neuromuscular (RODRIGUES *et al.*, 2004). Já a Bp-PLA₂ ácida possui uma alta atividade catalítica e miotóxica e inibe a agregação plaquetária.

1.6 Aplicações terapêuticas de toxinas de serpentes

Várias toxinas de peçonha de serpentes já foram isoladas e caracterizadas e, portanto, já se conhece o potencial farmacológico das mesmas. Um dos estudos pioneiros levou ao desenvolvimento do captopril®, um vasodilatador derivada da peçonha de *Bothrops jararaca* que atua sobre a enzima conversora de angiotensina, inibindo-a. A partir desses estudos, vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos com intuito de revelar o potencial biotecnológico de toxinas animais.

A Mutalisina 2 e a Amoditase são metaloproteinases de *Lachesis muta muta* e *Vipera ammodytes ammodytes*, respectivamente, que possuem uma importante ação trombolítica, são consideradas promissoras para o tratamento da trombose (AGERO *et al*, 2007; LEONARDI *et al*, 2006).

Outra classe de toxinas que possui um grande potencial terapêutico são as desintegrinas. Além de estarem envolvidas na inibição da agregação plaquetária, as desintegrinas têm ação sobre a metástase e crescimento tumoral, sendo que em relação ao câncer, as integrinas desempenham um papel no reconhecimento de receptores de tumor em diferentes tecidos. Algumas integrinas específicas são necessárias para interagir com determinadas moléculas da matriz extracelular (ECM). Quando esta interação muda, gera o crescimento descontrolado do tumor e conseqüente metástase (OKEGAWA *et al*, 2004; KURSCHAT E MAUCH, 2000; MZEJEWSKI, 1999; VELASCO VELAZQUEZ *et al*, 1999).

O interesse de se testar peçonhas de serpentes e suas toxinas como agentes farmacológicos, inclusive antitumorais, data desde o início do século

passado, quando Calmette *et al* (1933) demonstraram a atividade antitumoral da peçonha de *Naja sp* em células de adenocarcinomas.

Neste contexto, as toxinas fosfolipase A₂ apresentam uma variedade de efeitos farmacológicos, os quais podem ser direcionados para produção de novas drogas para tratamento de doenças importantes. Costa *et al* (2008) testaram toxicidade de uma PLA₂ miotóxica, isolada da peçonha de *Bothrops brazili*, sobre células tumorais humanas (JUKART), *E. coli* e *Leishmania sp*, mostrando que esta toxina possui atividade citotóxica sobre tais células e, ainda, que o peptídeo derivado da região C-terminal desta toxina também mostra os mesmo efeitos.

Bazaa *et al*, (2009) mostraram que as PLA₂ podem inibir tanto a adesão quanto a migração das células tumorais. Vários autores mostraram que estas toxinas são importantes agentes citotóxicos, com alta atividade sobre determinadas linhagens tumorais (GEBRIM *et al*, 2009; STÁBELI *et al*, 2006; COSTA *et al*, 2008).

A utilização da peçonha botrópica/botropóica bem como algumas de suas toxinas como ferramentas para o estudo da ação bacteriolítica e antitumoral, bem como outras atividades, vem sendo bastante exploradas por nosso grupo de pesquisa, onde das mesmas já isolamos e caracterizamos estrutural e funcionalmente várias toxinas. Rodrigues *et al.*, 2009 e Izidoro *et al.*, 2006 isolaram e caracterizaram duas L-aminoacido oxidases isoladas das peçonhas de *Bothrops pirajai* e *B. pauloensis*, respectivamente, e demonstraram que estas enzimas possuem atividade antitumoral importante. Gebrim *et al* (2009) utilizou uma PLA₂ miotóxica (BthTXI) e um peptídeo derivado da porção C-terminal da mesma toxina isolada primeiramente por Homsí-Brandeburgo *et al* (1988), e mostraram que ambos possuem atividade anti-tumoral sobre várias linhagens tumorais.

As PLA₂ e suas isoformas oferecem um grande desafio para os pesquisadores, no sentido de desvendar a sua estrutura e função. Pesquisas nesta área auxiliarão a determinar os mecanismos dos efeitos farmacológicos, bem como ampliar nosso conhecimento sobre o mecanismo de ação destas toxinas, seus efeitos deletérios, ou para efeitos contrários a algumas doenças importantes. Estes estudos são de extrema importância, pois podem subsidiar

conhecimentos em áreas correlatas como o desenvolvimento de drogas para tratamento de vítimas de acidentes ofídicos, desordens hemostáticas, bem como para o desenvolvimento de novas drogas com ação bactericida e antitumorais. Além disso, estes estudos resultarão em inovadoras oportunidades e caminhos para encontrar respostas para a toxicidade das PLA₂ e também para o desenvolvimento de proteínas com novas funções biológicas (KINI, 2003).

2.0 Referências Bibliográficas

AGERO, U.; ARANTES, R. M. E.; LACERDA-QUEIROZ, N.; MESQUITA, O. N.; MAGALHÃES, A.; SANCHEZ, E. F.; CARVALHO-TAVARES, J. Effect of Mutalysin II on Vascular Recanalization after Thrombosis Induction in the Ear of the Hairless Mice Model. **Toxicon**, v. 50, p. 698-706, 2007.

ALAPE-GIRÓN, A.; FLORES-DÍAZ, M.; SANZ, L.; MADRIGAL, M.; ESCOLANO, J.; SASA, M.; CALVETE, J. J. Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: Perspectives and applications. **Toxicon**, v. 54, p. 938-948, 2009.

ALBUQUERQUE, N. H.; COSTA, T. B. G.; CAVALCANTI, M. L. F. Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* notificados no estado da Paraíba. **Rev. de Biol. e Ciên. da Terra**, v. 5, n. 1, 1º sem., 2004.

AMARAL, A. A general consideration of snake poisoning and observations on Neotropical pit-vipers. **Contributions of Harvard Institute of Tropical Biology and Medicine**, v. 2, p. 1-64, 1925.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; FONTES, 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, p. 723-732, 2002.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Myotoxic phospholipase A₂ in *Bothrops* snake venom: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, p. 755-763, 2000.

ANTUNES, T. C.; YAMASHITA, K. M.; BARBARO, K. C.; SAIKI, M. SANTORO, M. L. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, 56, p. 1443-1458, 2010.

ARAYA, C.; LOMONTE, B. Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A₂ homologues of snake venoms. **Cell Biology International**, v. 31, p. 263-268, 2007.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; CORRÊA-NETO, C.; SILVA, M. M. S.; RODRIGUES, R. S.; TORRE, P. De La; PÉREZ, A.; SOARES, A. M.; ZINGALI, R. B.; NOGUEIRA, R. A.; RODRIGUES, V. M.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 1758-1776, 2010.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, R. S.; FONSECA, F. P. P.; MENALDO, D. L.; FERREIRA, F. B.; HENRIQUE-SILVA, F.; SOARES, A. M.; HAMAGUCHI, A.; RODRIGUES, V. M.; OTAVIANO, A. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: Analysis of gene expression profile. **Biochimie**, v. 91, p. 586-595, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: < portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_aap.pdf>. Acessado em 04/2011.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851-859, 2000.

CADLE, J. E. Phylogenetic relationships among vipers: immunological evidence. In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE Jr., E. D. (Eds). **Biology of the pitvipers**. Texas: Selva, p. 41-48, 1992.

CALMETTE, A.; SAENZ, A.; COSTIL, L. Effects du venim de cobra sur les greffes cancéreuses et le cancer spontané (adeno-carcinome) de la souris. **C. R. Acad. Sci.**, v. 197, p. 205-217, 1933.

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

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. (v. 2) New York: Cornell University, p. 870, 2004.

CHAVES, F.; TEIXEIRA, C. F. P.; GUTIÉRREZ, J. M. 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**, v. 45, p. 171-178, 2005.

CHIJIWA, T.; TOKUNAGA, E.; IKEDA, R.; TERADA, K.; OGAWA, T.; DAUEDA, N.; HATTORI, S.; NOZAKI, M.; OHNO, M. Discovery of novel [Arg49] phospholipase A2 isozymes from *Protobothrops elegans* venom and regional evolution of Crotalinae snake venom phospholipase A2 isozymes in the southwestern islands of Japan and Taiwan. **Toxicon**, v. 48, p. 672-682, 2006.

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bull. World Health Org.**, v. 75, p. 515-524, 1998.

CIDADE, D. A. P.; SIMÃO, T. A.; DÁVILA, A. M. R.; WAGNER, G.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L.; BOM, C.; ZINGALI, R. B.; ALBANO, R. M. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: Analysis of the gene expression

pattern. **Toxicon**, v. 48, p. 437-461, 2006.

COSTA, J. O.; FONSECA, K. C.; MAMEDE, C. C. N.; BELETTI, M. E.; SANTOS-FILHO, N. A.; SOARES, A. M.; ARANTES, E. C.; HIRAYAMA, S. N. S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; FONSECA, F.; HENRIQUE-SILVA, F.; PENHA-SILVA, N.; OLIVEIRA, F. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon**, v. 55, p. 1365-1377, 2010.

COSTA, F. L. S.; RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; MENALDO, D. L.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FULY, A. L.; SOARES, S. G.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BARRAVIERA, B.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 725-735, 2009.

COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; OLIVEIRA, C. Z.; SANTOS-FILHO, N. A.; TEIXEIRA, S. S.; NOMIZO, A.; FULY, A. L.; MONTEIRO, M. C.; SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; STÁBELI, R. G.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Myotoxic phospholipase 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, p. 1645-1656, 2008.

CUNHA, K. C. S.; FULY, A. L.; ARAÚJO, E. G. A phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* snake venom increases the survival of retinal ganglion cells *in vitro*. **Toxicon**, v. 57, p. 580-585, 2011.

DAVIE, E. W. A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 50819-50832, 2003.

DENEGRI, M. E. G.; ACOSTA, O. C.; HUANCAHUIRE-VEGA, S.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S.; MARUÑK, S. L.; TEIBLER, G. P.; LEIVA, L. C.; PONCE-SOTO, L. A. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternates* snake venom from Argentina. **Toxicon**, v. 56, p. 64-74, 2010.

DENNIS, E. A. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. **TiBS**, v. 22, p. 1-2, 1997.

DESSEN, A. Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A₂. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 40-47, 2000.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET Jr., R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, p. 617-640, 2009

FERNANDES, W.; ABE, A. S. An eletrophoretic approach to the relationships among the subspecies of the lancehead *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae). **Zool. Anz.**, v. 226, n. ¾, p. 195-201, 1991.

FERNÁNDEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M.; ÂNGULO, Y.; SANZ, L.; JUÁREZ, P.; CALVETE, J. J.; LOMONTE, B. Isolation of na acidic phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: Biochemical and toxicological characterization. **Biochimie**, v. 92, p. 273-283, 2010.

FLEER, E. A. M.; VERHEIJ, H. M.; DE HAAS, G. H. Modification on carboxilate groups in bovine pancreatic phospholipase A₂. **Europ. Journal Biochem**, v. 113, p. 283-288, 1981.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; CARLINI, C. R. and GUIMARAES, J. A. *Bothrops* sp. snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. **Comp. Biochem. Physiol**, vol. 119c, p. 21-29, 1998.

FREITAS, M. A.; GENO, P. W.; SUMMER, L. W.; COOKE, M. E.; HUDIBURG, S. A.; OWNBY, C. L.; KAISER, I. I.; ODELL, G. V. Citrate is a major component of snake venoms. **Toxicon**, v. 30, p. 461-464, 1992.

FULY, A. L.; MACHADO, O. L. T.; ALVES, E. W.; CARLINI, C. R. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Thromb. Haemost.**, v. 78, p. 1372-1380, 1997.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y. Tissue pathology induced by snake venoms: How to unsdertand a complex pattern of alteratios from a systems biology perspective?. **Toxicon**, v. 55, p. 166-170, 2010.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LÉON, G.; ALAPE-GIRÓN, A.; FLOREZ-DÍAZ, M.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; CALVETE, J. J. Snake venomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and controlo f antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 165-182, 2009a.

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, 2009b.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. **PLoS Medicine**, v. 3, p. 727-731, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, p. 915–931, 2003.

HARRIS, J. B. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. In: Snake Toxins. (HARVEY, A. L. Ed). p. 91-129, 1991.

HERPETOLOGIA, Sociedade Brasileira (SBH). Lista das espécies de répteis brasileiros. Disponível em: < www.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm >. Acessado em 03/2011.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon*, v. 26, p. 615-627, 1988.

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. **Bioorg. & Medicinal Chem.**, v. 14, p. 7034-7043, 2006.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F.; CARDOSO Jr., R. P.; ABE, A. S.; SEGURA, O. P. Agrupamento de serpente do gênero *Bothrops* pelos caracteres do hemipênis (Serpentes: Viperidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 24, 1987, Juiz de Fora. **Livro de Resumos XIV Congresso Brasileiro de Zoologia**, Juiz de Fora: UFMG, p. 358, 1987.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel Sul-Americana (*Crotalus durissus*). **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 34, p. 347-354, 1992.

KANG, T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M. T.; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R. K.; SINGH, T. P.; KINI, R. M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS journal**, p. 1-33, 2011.

KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; SOARES, A. M.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; GIULIATI, S.; FARIA-JR., M.; XAVIER, M. A. S.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R.; FRANÇA, S. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I-gene expression profile of highly expressed phospholipase A₂. **Biochimie**, v. 86, p. 211-219, 2004.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; SILVA, N. de; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; AVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; SILVA, H. J. de. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Medicine**, v. 5, p. 01-14, 2008.

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

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**. v. 42(8), p. 827-840, 2003.

KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, v. 25, p. 65-106, 1987.

KURCHAT, P.; MAUCH, C. Mechanisms of metastasis. **Clin Exp Dermatol**. v. 25, p. 482–489, 2000.

LAING, G. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 987-996, 2005.

LEONARDI, A.; FOX, J. W.; TRAMPUS-BAKIJ, A.; KRIZAJ, I. Ammodytase, a Metalloproteinase from *Vipera Ammodytes Ammodytes* Venom, Possesses Strong Fibrinolytic Activity. **Toxicon**. v. 49, p. 833-842, 2006.

LOMONTE, B.; ÂNGULO, 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. **Currente Pharmaceutical Design**, v. 16, p. 3224-3230, 2010.

LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; MACCARANA, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 29867-29873, 1994.

MACHADO, T. **Filogenia molecular das espécies de *Bothrops* do grupo *neuwiedii* (Serpentes, Viperidae)**. 2010. p. 26. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MAGRO, A. J.; MURAKAMI, M. T.; MARCUSSI, S.; SOARES, A. M.; ARNI, R. K.; FONTES, M. R. M. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. **Biochem. and Biophys. Research Com.**, v. 323, p. 24-31, 2004.

MAGRO, A. J.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 311, p. 713-720, 2003.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749-1800, 1998.

MASUDA, S.; MURAKAMI, M.; ISHIKAWA, Y.; ISHII, T.; KUDO, I. Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A2 enzymes in several human tissues. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1736, p. 200-210, 2005.

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.

MOLL, S.; KENYON, P.; BERTOLI, L.; DE MAIO, J.; HOMESLEY, H.; DEITCHER, S. R. Phase II Trial of Alfimeprase, a Novel-Acting Fibrin Degradation Agent, for Occluded Central Venous Access Devices. **Journal Of Clinical Oncology**, v. 24, n. 19, p. 3056-3060, 2006.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Curr. Pharmaceut. Des.** v. 28, p. 2893-2905, 2007.

MZEJEWSKI, G. J. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 222, p. 124-138, 1999.

NEIVA, M.; ARRAES, F. B. M.; SOUZA, J. V.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; PRIETO-DA-SILVA, A. R. B.; WALTER, M. E. M. T.; BRIGIDO, M. M.; YZMANE, T.; LÓPEZ-LOZANO, J. L.; ASTOLFI-FILHO, S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon**, v. 53, p. 427-436, 2009.

NUÑES, V.; CID, P.; SANZ, L.; TORRE, P. D. L.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUITIÉREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 57-58, 2009.

OKEGAWA T, PONG EC, LI Y, HSIEH JT. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, p. 445-457, 2004.

OLIVA, I. B.; COELHO, R. M.; BARCELLOS, G. G.; SALDANHA-GAMA, R.; WERMELINGER, L. S.; MARCINKIEWICZ, C.; ZINGALI, R. B.; BARJA-FIDALGO, C. Effect of RGD-disintegrins on melanoma cell growth and metastasis: Involvement of the actin cytoskeleton, FAK and c-Fos. **Toxicon**, v. 50, p. 1053-1063, 2007.

OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; MENDES, M. M.; HOMSI-BRADEBURGO, M. I.; HAMAGUCHI, A.; ALCANTARA, 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.

OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, vol. 37, p. 411-445, 1999.

PARKINSON, C. L.; CHIPPINDALE, P.; CAMPBELL, J. Multigene analyses of pitviper phylogeny with comments on their biogeographical history. In: SCHUETT, G. W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. (Eds.). **Biology of the vipers**. Utah: Eagle Mountain, p. 93-110, 2002.

PESANTES, O. S.; FERNANDES, W. Afinidade de *Bothrops erythromelas* aferida através da eletroforese do plasma e da morfologia do hemipênis (Serpentes: Viperidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 26, 1989, João Pessoa. **Livro de Resumos XVI Congresso Brasileiro de Zoologia**, João Pessoa: UFPB, p. 74-75, 1989.

PETERS, J. A.; OREJAS-MIRANDA, B. Catalogue of the neotropical Squamata. Part 1. Snakes. **V. S. Natl. Mus. Bul.**, v. 297, p. 1-6, 1970.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V.; FURTADO, M. F. D.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p. 842-851, 2008.

RODRIGUES, R. S.; SILVA, J. F.; FRANÇA, J. B.; FONSECA, F. P. P.; OTAVIANO, A. R.; SILVA, F. H.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S. K.; 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.

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. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, p. 153-165, 2007.

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(1), p. 305-314, 2004.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Structural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic Fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.381, n. 2, p. 213-224, 2000.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochem. and Physiol.** v. 121, p. 215–222, 1998.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; HO, B.; CHOW, V. T. K. Purification, characterization and bactericidal activities of vasic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys* (Chinese pallas). **Biochimie**, v. 90, p. 1372-1388, 2008.

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.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, . 52, p. 908-917, 2008.

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

SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. **Science**, v. 250, p. 1541-1546, 1990.

SILVA, V. X.; RODRIGUES, M. T. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**, v. 7, n. 1, p. 45-90, 2008.

SILVA, V. X. The *Bothrops neuwiedi* complex. In: CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. (Eds). **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. (v. 2) New York: Cornell University, p. 410-422, 2004.

SILVA, C. J. da; RIBEIRO, M. T. J.; RIBEIRO, L. A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon**, v. 41, p. 251-255, 2003.

SILVA, X. V. **Revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae)**. 2000. 134 p. Tese de doutorado - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (1B-USP), São Paulo, 2000.

SILVEIRA, P. V. P.; NISHIOKA. South American rattlesnake bite in a Brazilian teaching hospital. Clinical and epidemiological study of 87 cases, with analysis of factors predictive of renal failure. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 5, p. 562-564, 1992.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The Expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes:

classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1488, p. 1-19, 2000.

SOUZA, J. R. F.; MONTEIRO, R. Q.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. **Toxicon**, v. 39, p. 787-792, 2001.

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 Lys-49-phospholipase A₂ homologue: Na example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 142, p. 371-381, 2006.

STOCKER, K. Compositions of venoms snakes. In: **Medical use of snake proteins**, p. 33-56, 1990.

STOCKER, K.; FISCHER, H.; MEIER, J. Thrombin-like snake venom proteinases. **Toxicon**, v. 20, p. 265-273, 1982.

TANJONI, I.; EVANGELISTA, K.; DELLA-CASA, M. S.; BUTERA, D.; MAGALHÃES, G. S.; BALDO, C.; CLISSA, P. B.; FERNANDES, I.; EBLE, J.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to $\alpha_2\beta_1$ integrin and collagen. **Toxicon**, v. 55, p. 1093-1099, 2010.

TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; SILVA, F. M. N.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SILVA-Jr, F. P.; IZIDORO, L. F. M.; FULY, A. L.; JULIANO, M. A.; SANTOS, C. R.; MURAKAMI, M. T.; SAMPAIO, S. V.; SILVA, S. L.; SOARES, A. M. Molecular characterization of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom: Synthetic-peptide identifies its anti-platelet region. **Archives of Toxicology**, *In press*, 2011.

TEIXEIRA, C. F. P.; LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, U. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipase A₂. **Toxicon**, v. 42, p. 947-962, 2003.

TERRA, R. M. S.; PINTO, A. F. M.; GUIMARÃES, J. A.; FOX, J. W. Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): Insights into venom induced pathology. **Toxicon**, v. 54, p. 836-844, 2009.

TU, A. T. Snake venoms: General background and composition. In: **Venoms: Chemistry and Molecular Biology**, p. 1-19, 1988.

VALENTE, R. H.; GUIMARÃES, P. R.; JUNQUEIRA, M.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; SOARES, M. R.; CHAPEAUROUGE, A.; TRUGILHO, M. R. O.; LÉON, I. R.; ROCHA, S. L. G.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; WERMELINGER, L. S.; DUTRA, D. L. S.; LEÃO, L. I.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L.; ZINGALI, R. B.; PERALES, J.; DOMONT, G. B. *Bothrops insularis* venomomics: A proteomic

analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 241-255, 2009.

VELASCO-VELAZQUEZ, M. A.; MOLINA-GUARNEROS, J. A.; MENDOZA-PATINO, N.; SULLIVAN, J.; MANDOKI, J. J. Integrins and integrin-associated molecules: targets for the development of antimetastatic therapies. **Rev Invest Clin**, v. 51, p. 183–193, 1999.

WARRELL, D. A. Snake bite. **Lancet**, v. 375, p. 77-88, 2010.

WHITE, J. Snake venom and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, p. 951-967, 2005.

WÜSTER, W.; THORPE, R. S.; SALOMAO, M. G.; THOMAS, L.; PUORTO, G.; THEAKSTON, R. G. D.; WARRELL, D. A. Origin and phylogenetic position of the Lesser Antilean species of *Bothrops* (Serpentes, Viperidae): biogeographical and medical implications. **Bull. Nat. Hist. Mus. Lond. Zool.**, v. 68, n. 2, p. 101-106, 2002.

WÜSTER, W.; SALOMÃO, M. G.; THORPE, R.S.; PUORTO, G.; FURTADO, M. F. D.; HOGE, S. A.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Systematics of the *Bothrops atrox* complex: new insights from multivariate analysis and mitochondrial DNA sequence information. **Venemous snakes: ecology, evolution and snakebite**. Oxford: Oxford University, p. 99-113, 1997.

Capítulo 2

Caracterização bioquímico-farmacológica de uma PLA₂ ácida isolada da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*)

Resumo: As fosfolipases A₂ são moléculas pequenas, com peso molecular variando de 13 a 18 kDa, e um dos maiores constituintes das peçonhas botrópicas/botropóicas, exercendo uma variedade de efeitos tóxicos como neurotoxicidade, miotoxicidade, citotoxicidade, inibição ou ativação da agregação plaquetária, dentre outros. A maioria das PLA₂ tóxicas são proteínas básicas, no entanto as isoformas ácidas e suas possíveis ações são menos conhecidas. Neste trabalho, descrevemos a purificação e caracterização química, enzimática e farmacológica de uma nova fosfolipase A₂ ácida da peçonha de *Bothropoides pauloensis*. Esta enzima, denominada BpPLA₂-TXI, foi purificada através de quatro passos cromatográficos representando 1,5 % da peçonha total. É uma proteína monomérica de 13.6 kDa estimada por análises em MALDI TOF e ponto isoelétrico teórico calculado em 4.98. O cDNA codificante para a PLA₂ foi obtido por RT-PCR a partir do RNA total da glândula de peçonha, utilizando oligonucleotídeos baseados na sequência parcial de aminoácidos desta toxina. A sequência N-terminal da proteína dos primeiros 48 resíduos de aminoácidos, bem como a sequência completa deduzida partir de seu cDNA, apresentou 122 resíduos de aminoácidos os quais revelaram uma significativa similaridade com as Asp49 ácidas de outras peçonhas de serpentes. A BpPLA₂-TXI é cataliticamente ativa, com atividade específica de 142 U/mg, além de ser estável sob diferentes temperaturas e pHs. Foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida pelo colágeno, além de induzir edema e efeito miotóxico. A análise filogenética mostra que a BpPLA₂-TXI forma um grupo com outras PLA₂ Asp49 ácidas dos gêneros *Bothropoides* e *Bothrops*, as quais são caracterizadas por possuir alta atividade catalítica associada com a capacidade de inibir agregação plaquetária.

Palavras-chave: Fosfolipase A₂ D49; *Bothropoides pauloensis*; *Bothrops pauloensis*; Miotoxina; cDNA.

Abstract: The phospholipases A₂ are small molecules, with molecular mass from 13 to 18 kDa, and one of the most abundant components present in the botropics/botroipoics snake venoms, exerting a variety of toxic effects as neurotoxicity, myotoxicity, citotoxicity, anti or pro-platelet aggregation, and others. Most of the toxic PLA₂ are basic proteins, therefore, the acid PLA₂s isoforms and their possible roles are less understood. In this work, we described the purification and physic-chemical and pharmacological characterization of an acidic phospholipase A₂ from *Bothropoides pauloensis*. This enzyme, named BpPLA₂-TXI, was purified through four chromatographic steps and it represents 2,4% of the snake venom. It is a monomeric protein with 13.6 kDa by MALDI-TOF and theoretical isoelectric point of 4,98. The codified cDNA was obtained by RT-PCR from venom gland total RNA, utilizing oligonucleotides based on the amino acids partial sequences for this toxin. The N-terminal sequence (fourty-eight amino acids residues) as well as the complete sequence deduced by cDNA, show 122 amino acids residues which revealed significant similarity with other acidic Asp49 PLA₂. BpPLA₂-TXI is catalytically active, with specific activity of 142 U/mg and it is thermo- and pH-stable. Besides its catalytic activity, BpPLA₂-TXI displayed some farmacological effects, as inhibited platelet aggregation induced by collagen or ADP, induced edema and myotoxicity. The phylogenetic analyses shows that BpPLA₂-TXI forms a group with other acidic PLA₂ Asp49 from *Bothropoides* and *Bothrops* genus, wich are characterized by the a catalytic activity associated with anti-platelet effects.

Keywords: D49 Phospholipase A₂; *Bothropoides pauloensis*; *Bothrops pauloensis*; Myotoxic; cDNA.

1.0 Introdução

Em 2009, as serpentes do gênero *Bothrops* passaram por uma nova classificação, baseados em características morfológicas e moleculares (FENWICK *et al*, 2009) e essa nova classificação foi aceita pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Após esta reclassificação, a espécie antes conhecida como *Bothrops pauloensis* passou a se chamar *Bothropoides pauloensis*.

As manifestações clínicas observadas, após o envenenamento por serpentes botropóicas, podem ser tanto locais quanto sistêmicas, levando a quadros como hiperalgesia, edema, eritema, hemorragia, necrose, alterações na hemostasia e no sistema nervoso, dentre outras (WARRELL *et al*, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; ALBUQUERQUE *et al.*, 2004).

As peçonhas botrópicas/botropóicas são misturas muito complexas e contêm várias substâncias que podem ser ativas, as quais podem levar à alterações fisiopatológicas decorrentes do envenenamento. Aproximadamente 90% dos constituintes da peçonha são proteínas tóxicas ou não tóxicas. Também estão presentes, em menor proporção, citrato, íons metálicos, carboidratos, nucleotídeos, aminoácidos livres e lipídeos (SOUZA *et al*, 2001; FREITAS *et al*, 1992).

Várias destas proteínas já foram isoladas e caracterizadas bioquímica-farmacologicamente e, portanto, já se conhece o potencial farmacológico das mesmas. Alguns destes componentes já são utilizados como modelos moleculares para drogas já vendidas comercialmente, como é o caso do Captopril® (derivado do peptídeo isolado da peçonha de *Bothrops jararaca* (FERREIRA, 1965)). Várias outras proteínas já estão num estágio bem avançado no estudo clínico para sua utilização na medicina. A Mutalisina 2 e a Amoditase são enzimas de *Lachesis muta muta* e *Vipera ammodytes ammodytes*, respectivamente, que possuem uma importante ação trombolítica, e são consideradas promissoras para o tratamento da trombose (AGERO *et. al*, 2007; LEONARDI *et. al*, 2006).

Um dos principais componentes das peçonhas botrópicas/botropóicas, devido à variedade de seus efeitos tóxicos induzidos nas vítimas, são as toxinas

fosfolipases A₂ (PLA₂) (E. C. 3. 1. 1. 4.), que tem como substrato os fosfolipídeos, constituintes da membrana plasmática celular.

As PLA₂ enzimaticamente ativas catalisam a hidrólise especificamente na ligação 2-acil éster de fosfolipídios, liberando como produtos os lisofosfolipídios e ácidos graxos livres (SIX; DENNIS, 2000). Um destes ácidos pode ser o araquidônico, que é precursor de eicosanóides, como as prostaglandinas e hormônios, potentes mediadores da resposta inflamatória (DESSEN, 2000; DENNIS, 1997).

Estas enzimas podem possuir um resíduo de aspartato na posição 49 (D49), ou um resíduo de lisina na mesma posição (K49). As D49 são enzimaticamente ativas e as K49 possuem baixa ou nenhuma atividade enzimática (OWNBY *et al.*, 1999; KETELHUT *et al.*, 2003). Existem variantes da subclasse Lys49, como Arg 49 e Ser 49 presentes em algumas PLA₂s de peçonhas ofídicas já isoladas (CHIJIWA *et al.*, 2006)

As fosfolipases A₂ (PLA₂) de peçonhas de serpentes vêm sendo amplamente estudadas devido à variedade de seus efeitos farmacológicos, como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, citotoxicidade, ativação e/ou inibição da agregação plaquetária, anticoagulação, edema, convulsão, hipotensão, dentre outras, porém, nem todas as PLA₂ induzem todos esses efeitos (FRANCISCHETTI *et al.*, 1998; KINI, 2003; MASUDA *et al.*, 2005). A maioria das PLA₂ estudadas é básica, porém, nos últimos anos foram feitos vários trabalhos visando à caracterização de PLA₂ ácidas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2010; DENEGRÍ *et al.*, 2010). Apenas uma PLA₂ ácida foi isolada da peçonha de *Bothropoides pauloensis* por Rodrigues *et al.* (2007).

Vários trabalhos com PLA₂ ácida Asp49 mostram que estas enzimas são capazes de inibir a agregação plaquetária ativada por ADP ou colágeno (TEIXEIRA *et al.*, 2011; FERNÁNDEZ *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2007), bem como o peptídeo sintético obtido com base na sequência C-terminal de uma destas (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

As PLA₂ e suas isoformas se tornaram um grande desafio para os pesquisadores, no sentido de desvendar a sua estrutura e função. Estudos no sentido de se desvendar forma de ação destas toxinas auxiliarão a determinar os

mecanismos dos efeitos farmacológicos, bem como seus efeitos deletérios, ou para subsidiar novos estudos no tratamento de doenças importantes.

Portanto, este trabalho apresenta a purificação e caracterização química, enzimática e farmacológica de uma fosfolipase A₂ ácida da peçonha de *Bothropoides pauloensis*.

2.0 Material e Métodos

2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para os ensaios foram: Kit CK-Nac (Analisa); Coomassie Brilhante Blue R-250 (Sigma); Coomassie Blue G (Sigma); ADP (Helena Laboratories); Colágeno (Helena Laboratories); Ácido Araquidônico (Helena Laboratories); Epinefrina (Helena Laboratories); Ácido fosfórico (Vetec); Tris (Sigma); Azul de bromofenol (Merck Química Brazil); Glicerol (Merck Química Brazil); β-mercaptoetanol (Sigma); SDS (Sigma); Padrão de peso molecular 6L (Sigma); EDTA (Sigma); TRIZOL (GIBCO); Agarose (Sigma); Meio de cultura RPMI 1640 (Sigma). Os demais reagentes foram de grau analítico.

2.2 Obtenção da peçonha de *B. pauloensis*

A peçonha bruta da serpente *Bothropoides pauloensis* (PB) utilizada no presente trabalho foi obtida a partir de espécimes mantidas no serpentário Bioagents (Batatais-SP). Após a coleta, a peçonha foi imediatamente dessecada a vácuo à temperatura ambiente e conservada a -20°C.

2.3 Obtenção e manutenção dos animais para os ensaios biológicos

Camundongos Swiss foram obtidos e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da UFU com água e suplemento alimentar “*ad libitum*”, a uma temperatura de 22 ±1°C, luminosidade controlada e padrão sanitário convencional. Este projeto recebeu parecer favorável pelo Comitê de

Ética e Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob Protocolo de nº 08-2008.

2.4 Quantificação de proteínas

A quantificação das proteínas foi determinada pelo método de Bradford, 1976. Cada amostra foi diluída em 100 µL de água deionizada e adicionada a 3 mL do reagente Bradford (100 mg de Coomassie Blue G, 50 mL de etanol 95%, 100 mL de ácido fosfórico 85% e água deionizada suficiente para completar 1L de solução).

Em seguida, foram feitas medições das absorbâncias no espectrofotômetro Ultrospec 1000 UV/Visível (Pharmacia Biotech) em comprimento de onda de 595 nm. Com os valores das absorbâncias construiu-se uma curva para determinação da concentração das proteínas, tomando como padrão uma curva de Soroalbumina Bovina.

2.5 Purificação da fosfolipase A₂ ácida da peçonha de *Bothropoides pauloensis*

O fracionamento da peçonha bruta (PB) de *Bothropoides pauloensis* foi realizado primeiramente em uma coluna de troca iônica. Cerca de 170 mg da peçonha foram resuspendidos em 2,0 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7.8. Em seguida a amostra foi centrifugada a 10.000 *g* por 10 min a 4° C e o sobrenadante aplicado a uma coluna de troca iônica contendo a resina CM Sepharose Fast Flow (2,0 x 20,0 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão. A amostra foi eluída pelo estabelecimento de um gradiente convexo de concentração usando o tampão bicarbonato de amônio nas concentrações de 0,05 a 0,5 M. Frações de 1 mL/tubo foram coletadas num fluxo de 6,6 mL/hora em um coletor de frações Redifrac (Amersham Biotec). A absorbância das frações foi lida a 280 nm em um espectrofotômetro ULTROSPECH 1000. A fração com atividade fosfolipásica (CM1) foi recromatografada em uma coluna de exclusão molecular Sephacryl S-300 HR HiPrep 26/60 (GE HealthCare) equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8, e a amostra eluída, com o mesmo

tampão. As frações de 2,0 mL/tubo foram coletadas em um fluxo de 12,0 mL/h. Novamente, a fração com atividade fosfolipásica (S4) foi coletada e fracionada em coluna de troca iônica HiTrap Q FF 1 mL (GE HelthCare). Neste passo, quatro colunas foram conectadas em série, no intuito de aperfeiçoar o fracionamento, e equilibradas com o tampão bicarbonato de amônio 0,05 M e pH 7.6. Foi realizado um gradiente de concentração com o tampão bicarbonato de amônio 0,5 M e pH 7.6. Foram coletadas frações de 1,0 mL/tubo com um fluxo de 6,0 mL/h. A fração com atividade fosfolipásica (Q2) foi recromatografada em uma coluna C2-C18 μ RPC 4.6/100 (GE HelthCare) fase-reversa em um sistema de cromatografia líquida de alta performance (RP-HPLC). A coluna foi equilibrada com o solvente A (0,1% ácido trifluoracético, 4% acetonitrila) e eluída com um gradiente de concentração do solvente B (0,1% ácido trifluoracético, 80% acetonitrila) de 0% a 100%, com um fluxo de 0,5 mL/min por 33 min. Todos os passos de purificação da PLA₂ foram realizados à temperatura ambiente (25°C). A PLA₂ ácida pura obtida do fracionamento em RP-HPLC, chamada BpPLA₂-TXI foi liofilizada e utilizada em estudos de caracterização química/estrutural e farmacológica.

2.6 Caracterização química

2.6.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com agente desnaturante

A eletroforese com agente desnaturante (SDS) foi realizada segundo a técnica descrita por Laemmli (1970). Para o eletrodo foi utilizado um tampão Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1% (m/v) e pH 8.3. As amostras foram diluídas em Tris-HCl 0,06 M, azul de bromofenol 0,001% (m/v), SDS 6% (m/v), glicerol 10% (m/v) e β -mercaptoetanol 10% (m/v), pH 6.8 e aquecidas a 100°C por 5 min. Foi utilizado um sistema de eletroforese Hoefer SE260 Mighty Small Mini Vertical. Os géis foram corados em uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v) em água e metanol (1:1 v/v) e descorados numa solução de ácido acético a 7%. Como padrão de peso molecular foi utilizado o padrão Sigma 6L, contendo as proteínas: Soroalbumina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), Tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20.1

kDa) e α -lactoalbumina (14.4 kDa). Esta técnica foi realizada para a identificação e análise do grau de pureza da toxina de interesse.

2.6.2 Determinação do peso molecular e ponto isoelétrico teórico

A amostra foi submetida à análise espectrométrica de massa, usando um espectrômetro de massa AutoFlex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) controlado pelo software FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

A amostra foi misturada com solução matriz de ácido sinapínico (1:1, v/v) diretamente sobre uma placa específica (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) e secada a temperatura ambiente. A massa média da proteína foi obtida em modo linear com calibração externa, usando um Padrão de Calibração de Proteína (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). O software Flex Analysis 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) foi usado para a análise dos dados de espectrometria de massa. O ponto isoelétrico teórico foi determinado utilizando o programa CLC Sequence Viewer 6 por meio de análises *in silico* disponíveis em ([http:// www.clcbio.com/index.php?id=479](http://www.clcbio.com/index.php?id=479)).

2.7 Sequenciamento N-terminal

Aproximadamente 1,0 mg de BpPLA₂-TXI foi dissolvido em tampão Tris-HCl 250 mM, pH 8.2, contendo 0,1% (m/v) EDTA. Para cada mol de Cys, 30 mols de ditioneitol foram adicionados. Após a adição de N₂, a solução foi incubada por 4 horas a 50°C na ausência de luz. Então, vinilpiridina foi adicionada e a solução incubada “overnight”. A amostra reduzida foi, então, purificada em uma coluna C-18 RP-HPLC e a sequência N-terminal foi determinada usando um sequenciador PPSQ-23A Perkin-Elmer Procise (Applied Biosystem Division, Foster City, California) com identificação on-line dos derivados de feniltiohidantoina correspondentes.

2.8 Determinação da sequência completa do cDNA

2.8.1 Extração das glândulas veneníferas da serpente *Bothropoides pauloensis* e preparação do RNA total

As glândulas da serpente *Bothropoides pauloensis* foram coletadas três dias após a extração da peçonha e, imediatamente após, foi realizado o isolamento do RNA total. A extração do RNA total das glândulas de *B. pauloensis* foi realizada utilizando-se o reagente TRIZOL[®] (GIBCO). Inicialmente as glândulas foram maceradas em 1 mL de Trizol para cada 100 mg de tecido, agitando em vórtex e incubando por 5 minutos a 30°C. Foram adicionadas 0,2 mL de clorofórmio, as amostras foram agitadas vigorosamente por 15 segundos e incubadas a 30° C por 2 minutos, seguido de centrifugação a 12000 *g* por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para tubo de *eppendorf*, ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol para cada mL de Trizol[®], e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos, seguido de centrifugação a 12000 *g* por 10 minutos, a 4°C. O pellet foi lavado com etanol 75 % e centrifugado a 7550 *g* por 5 minutos à 4°C. Depois de secagem ao ar, o material foi ressuscitado em H₂O/DEPC, quantificado a 260 nm e a integridade analisada em gel de agarose 1% preparado em solução TBE (Tris-HCl 1 M pH 7.4; EDTA 0.5 M pH 8.0 e 10,8 g ácido bórico).

2.8.2 Síntese do cDNA e amplificação por PCR

A partir do RNA total isolado foi realizada a síntese do cDNA. Para a reação de transcrição reversa foi utilizada a enzima MMLV reverse transcriptase (Promega) de acordo com as normas do fabricante (6 µL de Tampão RT 1x, 2,5 µL de dNTPs 10 mM e 1 µL de enzima RT 200 U). Dois microlitros da reação de RT foram utilizados para amplificar o cDNA da toxina, utilizando 4,0 µL de dNTP 10 mM, 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 2,5 µL de Tampão 10X, 1,0 µL de cada primer 12 mM (forward 5'- GAT CAT GAA AAT TGC GGG GA -3' específico; M13 reverse universal 5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3' (GE Healthcare)) e 0,3 µL de Taq DNA Polimerase 1,5 U. Os produtos da PCR foram analisados quanto ao

tamanho amplificado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,0% com tampão TBE. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e revelado sob a luz ultravioleta. As bandas referentes ao gene de interesse foram recortadas e a purificação dos genes presentes foi realizada utilizando-se o kit Concert Rapid PCR Purification System (Gibco BRL), conforme especificações do fabricante. A quantificação do cDNA foi realizado em espectrofotômetro pela determinação da absorbância em 260 nm (1 U Abs 260 corresponde a 50 µg/mL de DNA fita dupla).

2.8.3 Construção e preparação do oligonucleotídeo

Os oligonucleotídeos utilizados foram o forward 5' e o M13 reverse universal 3'. O Forward 5' foi desenhado com base na sequência N- terminal determinada para a toxina previamente isolada. Foram realizadas otimizações para verificar a temperatura de anelamento dos primers e o número de ciclos ideais para amplificação do gene.

2.8.4 Clonagem do cDNA em vetor e transformação bacteriana

O fragmento amplificado por PCR foi clonado em vetor (p-GEM-T Easy Vector System, Promega®) (Anexo I). A reação de ligação do produto de PCR ao vetor foi constituída de 1 µL de T4 DNA ligase (3 U/µL), 2 µL de tampão de T4 DNA ligase 1X, 1µL do pGEM-T (25 ng/µL) e aproximadamente 20 ng do produto amplificado, para uma reação final de 10 µL. Esta reação permaneceu em termociclador a 4°C por 16 horas. Após a ligação, os plasmídios (vetores) foram inseridos por eletroporação em células competentes de *E. coli* linhagem XL-1Blue eletrocompetentes. Nesse processo, 10 µL do material ligado foi adicionado a 200 µL de células competentes em cubetas de eletroporação de 1,5 ml estéreis. Em seguida, as células foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e foram adicionados 3000 µL de meio SOC (128,4 µL KCl₂ M; 100 µL MgSO₄ 1 M; 100 µL MgCl₂ 1M; 200 µL de glicose 1 M; 10 mL de meio LB 2X) com posterior incubação por 1 hora a 37°C com agitação de 110 rpm. Após esse período, foram feitas culturas dessas bactérias semeando 150 µL das células em placa de Petri

contendo meio LB sólido [2g de Triptona; 1g de Extrato de Levedura; 1g de NaCl; 1,5g de Ágar; água Mili-Q suficiente para completar o volume de 100 mL suplementado com 50 µL de ampicilina (100 mg/mL) por aproximadamente 16 horas à 37°C, para posterior seleção de colônias transformadas. Sobre o meio de cultura das placas de Petri, espalhou-se, previamente, 70 µL de X-Gal (50 mg/mL).

2.8.5 Sequenciamento automático do cDNA

O sequenciamento foi realizado em um sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences) do Laboratório de Nanobiotecnologia, com colaboração do Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. Os fragmentos clonados foram sequenciados a partir das extremidades 5' e 3'. As reações de sequenciamento foram feitas em microplacas utilizando-se 0,5 µL dos terminadores Big Dye, 100 ng de DNA plasmidial, 10 pmoles dos iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de interesse, 3,5µL de tampão 2,5X (400 mM Tris-HCl, pH 9,0; 10 mM MgCl₂), completando-se o volume da reação com H₂O milli-Q estéril para 10 µL.

A sequência de DNA obtida foi submetida à consulta de similaridade de nucleotídeos com sequências depositadas no *GenBank*, em acesso ao endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov do NCBI (National Center for Biotechnology Information). A ferramenta utilizada para esta consulta foi o BLAST nucleotide-nucleotide – Basic Local Alignment Search Tools.

2.9 Análise Filogenética

A sequência protéica da BpPLA₂-TXI foi alinhada utilizando o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) com outras PLA₂ ácidas da família Viperidae. Um grupo de PLA₂ básicas também foi incluído. Como *outgroup* foi incluída uma PLA₂ pancreática Humana. A análise filogenética foi realizada utilizando o software MEGA 4 pelo método “Neighborjoining” (NJ).

Foram realizadas 1000 réplicas (árvores aleatórias) e aquela com maior consenso entre as sequências foi utilizada.

2.10 Ensaios Enzimáticos e Farmacológicos

2.10.1 Atividade fosfolipase A₂ (PLA₂)

A atividade PLA₂ foi determinada por titulação potenciométrica segundo o método descrito por De-Haas *et al* (1968). Como substrato foi utilizado uma emulsão de gema de ovo (uma gema completando o volume para 50 mL com água destilada) em presença de desoxicolato de sódio 0,03 M e CaCl₂ a 0,6 M (15 mL da solução aquosa de gema de ovo, 10 mL de deoxicolato de sódio e 1 mL de cloreto de cálcio, completando o volume de 100 mL com água destilada). Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com uma solução padrão de NaOH 0,09704N em pH 8,0 e temperatura ambiente. A atividade fosfolipase A₂ foi expressa em microequivalentes de base consumida por minuto, e a atividade específica foi expressa pelo número de μ equivalentes de base consumida por minuto, por mg de proteína. Por definição, 1 unidade de atividade específica corresponde ao consumo de 1 microequivalente de base por mg de proteínas em um minuto. Ainda foram realizados testes de estabilidade da enzima sob a influência do pH, incubando a amostra (BpPLA₂-TXI), por 30 min a 25°C, em diferentes tampões (variando o pH de 2.5 a 11.0), e da temperatura (variando de 4 a 100°C), deixando as amostras por 30 min em cada temperatura. A amostra também foi incubada com EDTA por 30 min a 25°C, na concentração final de 10 mM para avaliação da atividade catalítica na ausência de Ca²⁺. Para cada ensaio foram utilizados 10 μ g (RODRIGUES, 2006) de proteínas dosadas, em triplicata.

2.10.2 Inibição da agregação plaquetária por análise turbidimétrica

A agregação plaquetária foi determinada utilizando-se o método previamente descrito por Fuly *et al* (1997), com modificações. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado a partir do sangue citratado (0,31% p/v) de

camundongo. Os animais foram anestesiados com éter dietílico (5,50 ml/L) e sangrados por punção cardíaca. Após a coleta do sangue, este foi centrifugado a 1.800 rpm por 12 min a temperatura ambiente. Amostras do PRP obtidas foram centrifugadas a 3.500 rpm por 20 min e os “pellets” de plaquetas foram ressuspensos em uma solução de Tyrode livre de cálcio, contendo 0,35% (p/v) de soroalbumina bovina (BSA) e 0,1 mM de EDTA (concentração final), pH 6,5 e lavados duas vezes por centrifugação. O “pellet” final foi então ressuspendido em solução tyrode-BSA, pH 7,5 sem EDTA. A suspensão foi ajustada para dar uma concentração de $3-4 \times 10^5$ plaquetas/ μ L. A agregação plaquetária foi medida turbidimetricamente utilizando um agregômetro AggRAM (Helena Laboratories). As amostras foram deixadas a 37°C em cubetas de vidro siliconizadas utilizando 225 μ L de plaquetas lavadas sob agitação, e a agregação foi iniciada após pré-incubação por 30 minutos com diferentes concentrações da toxina na presença de CaCl_2 1,0 mM (concentração final). Como agonistas da agregação plaquetária foram utilizados ADP (20 μ M), colágeno (10 μ g/mL), ácido araquidônico (500 μ g/mL) e epinefrina (300 μ M) (Helena Laboratories), e suas concentrações são determinadas pelo fabricante.

2.10.3 Atividade edematogênica

A atividade edematogênica induzida pela PLA_2 foi determinada utilizando grupos de camundongos Swiss ($n=4$, 18-22g). Os animais foram injetados por via intradérmica, na região subplantar da pata direita com 50 μ L de solução contendo 10 μ g de peçonha bruta ou BpPLA_2 -TXI dissolvidos em salina. No grupo controle foram injetados 50 μ L de salina. A medição das patas foi realizada em diferentes intervalos (30', 1, 3, 6 e 24 horas) de tempo a partir do tempo 0h (o qual era subtraído de cada valor obtido). O aumento da área na pata dos camundongos foi medido com um paquímetro de baixa pressão 0,01 mm (Mytutoyo, Japão) e expresso diretamente em mm de edema induzido.

2.10.4 Atividade miotóxica analisada por dosagem de creatina cinase no plasma

Aproximadamente 20 µg de peçonha bruta, BpPLA₂-TXI ou a PLA₂ BnSP-7 (isolada de *B. neuwiedi pauloensis*) foram dissolvidos em 50 µL de solução salina e inoculados no músculo gastrocnemius direito de camundongos machos Swiss (18-22g, n=3). Os animais controles receberam 50 µL de solução salina. Após 3 horas os animais foram anestesiados com éter dietílico (5,50 ml/L) e sangrados por punção cardíaca. O sangue dos animais foi imediatamente centrifugado a 2500 g por 10 min a 4°C para obtenção do soro. 50 µL do soro foram incubados com 1,0 mL da solução reativa por 3 min a 37°C. Em seguida, foram realizadas leituras a 340 nm nos intervalos de 0 a 3 min. A atividade da enzima creatina cinase foi determinada utilizando-se o kit CK-Nac (Analisa) e expressa em unidades/litro.

2.11 Avaliação da ação da toxina sobre culturas de células tumorais

2.11.1 Meio de cultura celular para células tumorais

A manutenção das linhagens de células tumorais, a dissolução das toxinas testadas e a realização dos ensaios de citotoxicidade, seguiram o protocolo do ATCC (American Type Culture Collection), utilizando meio RPMI 1640 suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), 20 mM de L-glutamina, 7,5% de bicarbonato de sódio e 10 µg/mL de gentamicina (meio completo). Este meio foi preparado na hora do uso e esterilizado por filtração em membranas de 0,22 µm.

2.11.2 Linhagem de células tumorais

Foram utilizadas as seguintes linhagens de células tumorais: MEF (Mouse Embryonic Fibroblast); Sarcoma 180 (TIB-66); TG-180 (CCRF S 180 II); Carcinoma de ovário humano (OVCAR-3). A linhagem tumoral humana foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira, do Instituto de Genética e

Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia e as linhagens MEF (Mouse Embryonic Fibroblast), Sarcoma 180 (TIB-66) e TG-180 (CCRF S 180 II), foram obtidas no Laboratório de Imunologia do Instituto de Imunologia e Parasitologia Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia.

2.11.3 Cultura de células tumorais

As células tumorais foram cultivadas em frascos para cultivo celular estéreis com 175 cm², contendo RPMI 1640 acrescentado de glutamina (2mmol/L), bicarbonato de sódio (1,5 g/L), glicose (4,5 g/L), HEPES (10 mmol/L, piruvato de sódio (1,0 mmol/L) e soro fetal bovino 10% (v/v), seguindo o protocolo do ATCC (American Type Culture Collection). Para fins experimentais, as células foram cultivadas em microplacas de 96 poços (200µL/poço), fundo chato com tampa. As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera 5% de CO₂.

2.11.4 Atividade citotóxica

Para realização da atividade citotóxica as linhagens de células tumorais e macrófagos peritoneais foram transferidos para tubos “Falcon” para procedimentos de lavagem. As células foram lavadas três vezes por centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos em meio completo. Ao final da última lavagem, as células foram ressuspensas em 5 mL de meio RPMI completo. Uma alíquota de 10 µL da suspensão celular foi colocada em 90 µL de azul de Tripán 1% (m:v) (SIGMA, EUA) e contadas em Câmara de Neubauer.

Para realização dos testes de citotoxicidade, 2x10⁵ células tumorais foram plaqueados em microplacas de 96 poços, na presença ou na ausência das toxinas (diferentes concentrações). Em seguida, as células foram incubadas por 24h a 37°C, em estufa umidificada. Após a incubação, as células viáveis foram quantificadas colorimetricamente utilizando a técnica padrão do MTT com algumas modificações. Foram adicionados 10 µL (0,5 mg/mL) do reagente MTT (brometo de 2,5-difenil-terazolio-3-[4,5- dimetiltiazol-2-yl]) em cada poço, após 4h de incubação a 37°C os cristais de formazan produzidos pela redução do MTT foram solubilizados pela adição de 50 µL de duodecil sulfato de sódio (SDS) em

cada poço. A redução do MTT foi quantificada pela leitura da absorbância a 540 nm do produto solubilizado, utilizando um leitor de placa.

O cálculo da porcentagem de atividade citotóxica das toxinas foi obtido utilizando a seguinte fórmula:

A (% proliferação das células na presença da toxina)

$$A = \frac{\text{leitura da absorbância das células na presença da toxina} \times 100}{\text{leitura da absorbância das células somente na presença do meio de cultura}}$$

$$B = \% \text{ atividade citotóxica} = 100 - A.$$

2.12 Análises estatísticas

A montagem dos gráficos, cálculos das médias e desvios padrões das médias foram realizadas com auxílio dos softwares Micrococcal Origin e Sigma Plot. A determinação das significâncias entre as médias (análise de variância) e os testes de significância da diferença entre duas médias foram realizados utilizando-se o Teste t de Student, e os valores de $P < 0,001$ e $> 0,1$ foram considerados estatisticamente significantes. Os dados foram apresentados como média ou desvio padrão.

3.0 Resultados

3.1 Purificação e caracterização química da PLA₂ ácida (BpPLA₂-TXI) de *Bothropoides pauloensis*

O primeiro passo do fracionamento da peçonha total de *Bothropoides pauloensis* foi realizado em uma coluna de troca iônica CM-Sepharose *Fast Flow* por meio de um gradiente de concentração contendo Tris-HCl 0,05 M a 0,5 M. Este fracionamento produziu seis picos principais, denominados de CM1, CM2, CM3, CM4, CM5 e CM6, como mostrado na **Figura 1A**. A fração com atividade fosfolipásica (CM1) foi recromatografada em uma coluna Sephacryl-S300 HR HiPrep 26/60 resultando em sete novas frações, S1 a S7 (**Figura 1B**). A fração com maior atividade fosfolipásica, fração S4, foi submetida a uma nova cromatografia de troca iônica, Hi-Trap Q *Fast Flow*, e duas frações principais

foram obtidas desta cromatografia, Q1 e Q2 (**Figura 1C**). A fração Q2, a qual possui atividade fosfolipásica, foi, então, aplicada em uma coluna de fase reversa (RP-HPCL) C2-C18 μ RPC 4.6/100 (GE HelthCare) no intuito de remover traços de outros componentes da peçonha. A PLA₂ ácida foi eluída em RP-HPLC com aproximadamente 80% do solvente B sendo denominada de BpPLA₂-TXI (**Figura 1D**). A toxina purificada foi observada em PAGE-SDS em condições redutoras, apresentando uma banda única com *Mr* aproximadamente de 15.000 Da (**Figura 1E**). Quando analisada por MALDI-TOF apresentou uma massa molecular 13.682 Da (**Figura 2**). A PLA₂ apresentou um pI teórico de 4.98, determinado com base na sequência deduzida a partir do cDNA utilizando o programa CLC Sequence Viewer 6 por meio de análises *in silico* disponíveis em (<http://www.clcbio.com/index.php?id=479>).

O rendimento protéico das frações e a recuperação da atividade fosfolipásica estão apresentados na **Tabela 1**. Esta toxina representa 2,6 % da peçonha de *B. pauloensis* e apresentou uma atividade específica de 142 U/mg, com um fator de purificação de 2,7.

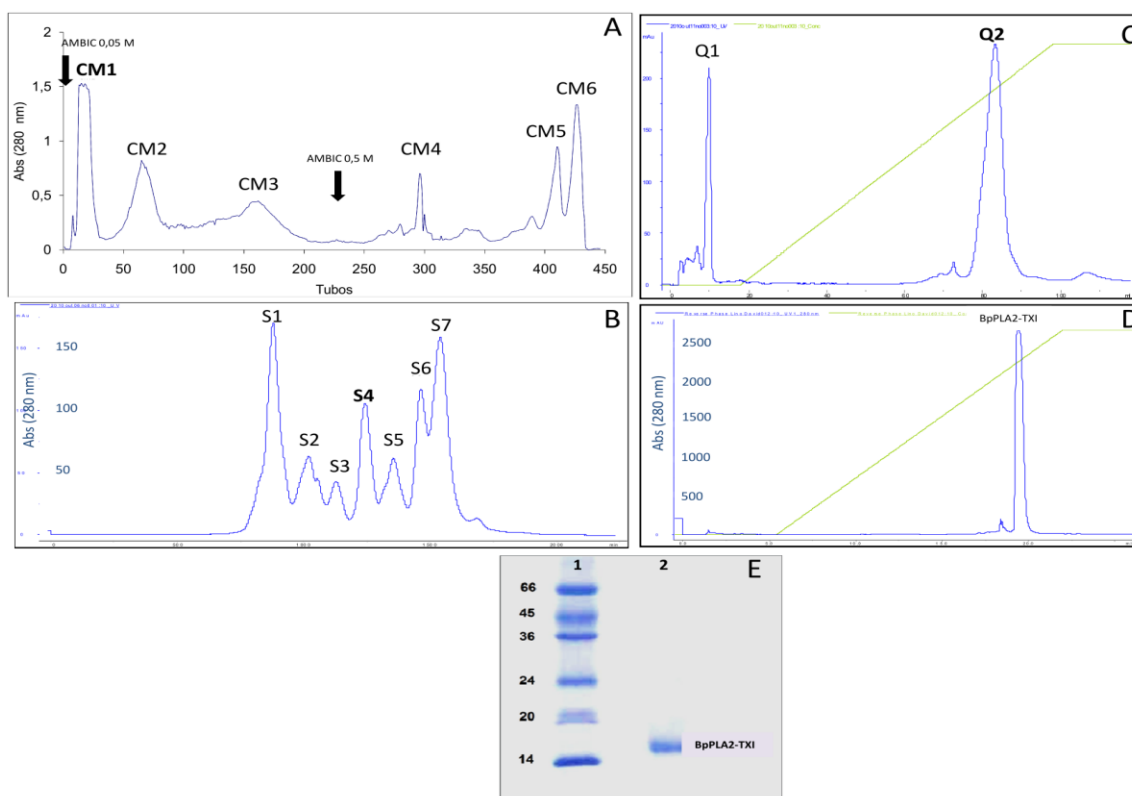


Figura 1: Purificação da PLA₂ ácida da peçonha de *Bothropoides pauloensis*. **(A)** Cromatografia em CM-Sepharose de 170 mg da peçonha bruta de *Bothropoides pauloensis*. As frações foram identificadas como CM1 a CM6. A amostra foi eluída em um gradiente linear de bicarbonato de amônio (0,05-0,5 M), com um fluxo de 6,6 mL/h, coletando frações de 1 mL/tubo. **(B)** Cromatografia em Sephacryl-S300 de 60 mg da fração CM1. A coluna foi equilibrada e eluída com um tampão bicarbonato de amônio 0,05 M com um fluxo de 12 mL/h, coletando 2 mL/tubo. Sete frações foram obtidas (S1 a S7). **(C)** Cromatografia em HiTrap Q FF 1 mL (GE HelthCare) de aproximadamente 8 mg da fração S4, resultando em dois picos, Q1 e Q2. Foi realizado um gradiente linear com o tampão bicarbonato de amônio 0,05 a 0,5 M e pH 7,6, com um fluxo de 6,0 mL/h. **(D)** Perfil cromatográfico obtido do fracionamento de 2 mg do pico Q2 em coluna de fase reversa (RP-HPLC) C2-C18. A PLA₂ foi eluída utilizando um gradiente de concentração do solvente A (0,1% TFA, 4% acetonitrila) para o solvente B (0,1% TFA, 80% acetonitrila) de 0% a 100%, com um fluxo de 0,5 mL/min, por 33 min, coletando 0,5 mL/tubo. **(E)** Perfil eletroforético (12% PAGE-SDS) em condições redutoras: 1) Padrão de Peso Molecular; 2) PLA₂ ácida (BpPLA₂-TXI).

Tabela 1: Recuperação protéica e recuperação da atividade enzimática da peçonha bruta e das frações de interesse.

Fração	Proteína		Atividade Fosfolipásica		
	mg	%Recup.	U/mg	U-Total	Fator de Purificação
PB	170	100	51	8670	1
CM1	60	35	87	5220	1,7
S4	20	11,7	113	2260	2,2
Q2	7,5	4,4	135	1012	2,6
BpPLA2-TXI	4,5	2,6	142	639	2,78

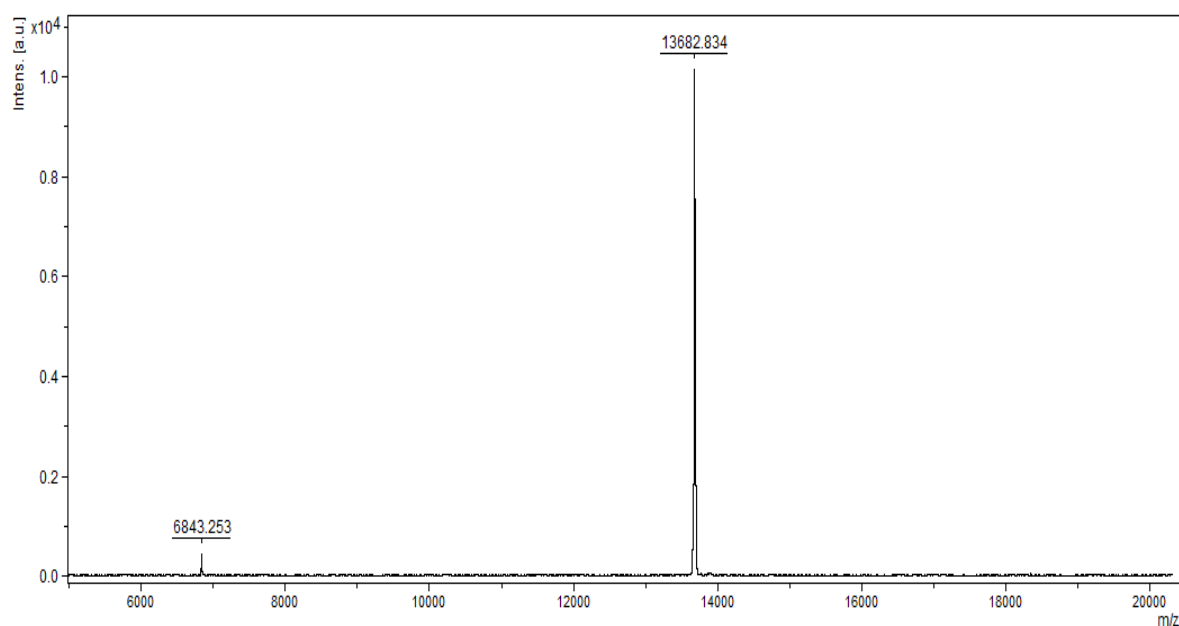


Figura 2: Determinação do peso molecular da BpPLA₂-TXI por MALDI-TOF em espectrômetro de massa (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

3.2 Determinação das sequências N-terminal e cDNA da BpPLA₂-TXI

A sequência dos primeiros 48 resíduos de aminoácidos da PLA₂ BpPLA₂-TXI está apresentada na **Figura 3**. Esta proteína contém o resíduo Asp na posição 48 (posição 49 da díade catalítica) de acordo com a numeração primeiramente demonstrada por Renetseder *et al* (1985), dessa forma a PLA₂ isolada no presente trabalho é uma Asp49 PLA₂. Análises da região N-terminal da BpPLA₂-TXI mostraram que ela contém resíduos de aminoácidos conservados envolvidos no domínio de ligação do cálcio e no sítio catalítico (Tyr28, Gly30, Gly32, His48 e Asp49)

A sequência N-terminal da BpPLA₂-TXI permitiu realizar a amplificação e clonagem do gene desta toxina, através do desenho do oligonucleotídeo, o qual é formado por 417 pares de bases, codificando uma proteína madura de 122 resíduos de aminoácidos (**Figura 3**).

>BpPLA ₂ -TXI																
1	ATG	AGG	ACT	CTC	TGG	ATA	ATG	GCC	GTG	TTG	CTG	GTG	GGC	GTC	GAG	45
1	M	R	T	L	W	I	M	A	V	L	L	V	G	V	E	15
46	GGG	AAC	CTG	GTG	CAA	TTT	GAG	ACG	TTG	ATC	ATG	AAA	ATT	GCG	GGG	90
16	G	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>Q</u>	<u>F</u>	<u>E</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>M</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	30
91	AGA	AGT	GGT	GTT	TGG	TAC	TAC	GGC	TCT	TAC	GGA	TGC	TAC	TGC	GGC	135
31	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>Y</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	45
136	TCG	GGA	GGC	CAA	GGC	CGG	CCA	CAG	GAC	GCC	AGC	GAC	CGC	TGC	TGC	180
46	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>R</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	60
181	TTT	GTG	CAC	GAC	TGC	TGT	TAT	GGA	AAA	GTG	ACC	GAC	TGC	GAC	CCC	225
61	<u>F</u>	<u>V</u>	<u>H</u>	<u>D</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	75
226	AAA	GCG	GAC	GTC	TAC	ACC	TAC	AGC	GAG	GAG	AAC	GGG	GTT	GTC	GTC	270
76	K	A	D	V	Y	T	Y	S	E	E	N	G	V	V	V	90
271	TGC	GGA	GGG	GAC	GAC	CCG	TGC	AAG	AAG	CAG	ATT	TGT	GAG	TGC	GAC	315
91	C	G	G	D	D	P	C	K	K	Q	I	C	E	C	D	105
316	AGG	GTT	GCG	GCA	ACC	TGC	TTC	CGA	GAC	AAT	AAG	GAC	ACA	TAC	GAA	360
106	R	V	A	A	T	C	F	R	D	N	K	D	T	Y	D	120
361	AAC	AAA	TAT	TGG	TTT	TCC	CCG	GCC	AAA	AAT	TGC	CAG	GAG	GAA	TCA	405
121	N	K	Y	W	V	F	P	A	K	N	C	Q	E	E	S	135
406	GAG	CCA	TGC	TAA	417											
136	E	P	C	*												

Figura 3: Sequência do cDNA e dedução da sequência de aminoácidos da BpPLA₂-TXI. A sequência N-terminal obtida pelo sequenciamento pelo método de Edman está sublinhada. O símbolo (*) representa o “stop códon”.

A **Figura 4** mostra o alinhamento da BpPLA₂-TXI com outras fosfolipases A₂ isoladas da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*), sendo duas PLA₂ Lys49 básicas BnSP-6 e BnSP-7 (RODRIGUES *et al*, 1998), duas Asp49 básicas BnpTX-I e BnpTX-II (RODRIGUES *et al*, 2004) e uma Asp49 ácida BP-PLA₂ (RODRIGUES *et al*, 2007).

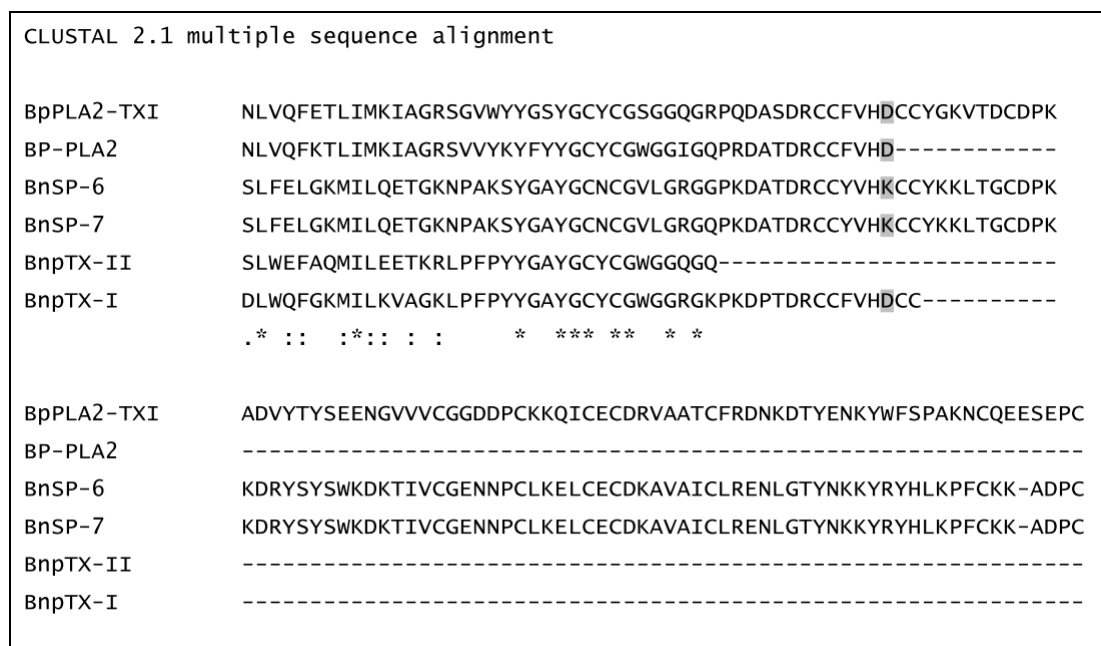


Figura 4: Alinhamento da BpPLA₂-TXI com outras fosfolipases isoladas da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*; *Bothrops newviedi pauloensis*). Foram utilizadas as sequências completas da PLA₂ BnSP-6 e 7 (números de acesso: 49258448 e 51247138, respectivamente) (RODRIGUES *et al*, 1998), as sequências parciais das PLA₂ BnpTX-I e II (RODRIGUES *et al*, 2004) e a sequência parcial da PLA₂ BP-PLA₂ (RODRIGUES *et al*, 2007). O símbolo (*) representa resíduos de aminoácidos conservados para todas as sequências.

A **Figura 5** mostra o alinhamento da sequência da BpPLA₂-TXI comparada com outras PLA₂ ácidas e básicas já caracterizadas de outras serpentes. Esta enzima possui sequências de domínios altamente conservados comuns aos grupos das PLA₂ Asp49, possuindo 14 resíduos de cisteína, marcados em cinza.

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment		
BpPLA2-TXI		NLVQFETLIMKIAGRSGVWYYGSYGCYCGSGGQGRPDASDRCCFVHDCC
ABC96692.1	Bothrops_erythromel	SLVQFETLIMKIAGRSGVWYYGSYGCYCGSGGQGRPDASDRCCFVHDCC
AAO27454.1	Bothrops_jararacuss	DLWQFGQMILKETGKLPFPYYTTYGCYCGWGGQGRPKDATDRCCFVHDCC
AAR14163.1	Sistrurus_catenatus	NLLQFNKMIKIMTKKNAIPSSYSSYGCYCGWGGGRPKDATDRCCFVHDCC
BAC02719.1	Trimeresurus_flavov	HLLQFRKMIKKMTGKEPIVSYAFYGCYCGKGGGRPKDATDRCCFVHDCC
AAN37410.1	Bothrops_jararacuss	SLWQFGKMINYVMGESVQLQYLSYGCYCGLGQGGQPTDATDRCCFVHDCC
AAM09694.1	Bothrops_insularis	NLWQFGKMMNYVMQSVVYKYFYGCYCGWGGIGQPRDATDRCCFVHDCC
AAW92118.1	Cerrophidion_godman	NLMQFERLIMKVAKRSGMFWYSAYGCYCGWGGQGRPDPTDRCCFVHDCC
ABG26993.1	Sistrurus_catenatus	NLIQFETLILKVAKSGMFSYSAYGCYCGWGGHGRPDATDRCCFVHDCC
AAW92121.1	Trimeresurus_gracil	SLMQFEMLIMKLAKSSGMFWYSAYGCYCGWGGQGRPDATDRCCFVHDCC
AAM80563.1	Crotalus_viridis_vi	NLVQFELLIMKVAKRSGLLSYSAYGCYCGWGGHGRPDATDRCCFVHDCC
AAM80565.1	Crotalus_viridis_vi	NLVQFELLIMKVAKRSGLLSYSAYGCYCGWGGYGRPDATDRCCFVHDCC
AAS79431.1	Sistrurus_catenatus	SLVEFETLIMKIAGRSGVWYYSSYGCYCGTGGQGWPDASDRCCFVHDCC
BAA08383.1	Ovophis_okinavensis	HLMQFETLIMKIAGRSGVWYYGSYGCYCGAGGQGRPDPSDRCCFVHDCC
BAA01568.1	Trimeresurus_flavov	HLMQFENIMKKVTGRSGIWWYGSYGCYCGKGGEGRPQDPSDRCCFVHDCC
AAP48897.1	Viridovipera_stejne	HLMQFETLIMKVAKRSGVWYYGSYGCYCGAGGQGRPDASDRCCFVHDCC
AAW92117.1	Bothriechis_schlege	DLLQFEGIMMTIAGRSGLIWWYGSYGCYCGAGGQGRPDASDRCCFVHDCC
AAB71849.1	Gloydus_halys	SLMQFKTLIMKIAGRSGIWWYGSYGCYCGGGQGRPDASDRCCFVHDCC
ADB77855.1	Lachesis_muta	--MQFGDLINKIARRNGILYYSFYGCYCGLGGRGRPDATDRCCFVHDCC
AAP48894.1	Viridovipera_stejne	SVIELGKMI FQETGKNPATSYGLYGCNCGPGGRRPKDATDRCCYVHKCC
BAA06553.1	Trimeresurus_gramin	SVIELGKMI FQETGKNPATSYGLYGCNCGPGGRRPKDATDRCCYVHKCC
AAP48892.1	Viridovipera_stejne	SLVLQGMIFQETGKNPATSYGLYGCNCGPGGRRPKDATDRCCFVHKCC
* : : : *		
BpPLA2-TXI		YGKVTDCDPKADVYTYSEENGVVCGDDPCCKKQICECDRVAATCFRDNK
ABC96692.1	Bothrops_erythromel	YGKVTDCDPKADVYTYSEENGVVCGDDPCCKKQICECDRVAATCFRDNK
AAO27454.1	Bothrops_jararacuss	YGKLTNCKPKTDYRYSYRENGVVICGEGTPCEKQICECDKAAAVCFRENL
AAR14163.1	Sistrurus_catenatus	YEKLTDCSPKTDYTSYSLKSGVVICGGNDPCCKKQICECDKAAAVCFGENL
BAC02719.1	Trimeresurus_flavov	YGKVTGCDPKWDYTYTYSENGDIVCEGDNPC TKEVCECDKAAAI CFRDNL
AAN37410.1	Bothrops_jararacuss	YGKVTGCDPKIDSYTSYKKNQDVVCGDDPCCKKQICECDRVATTCFRDNK
AAM09694.1	Bothrops_insularis	YGKVTGCDPKTDYTSYKKNQDVVCGDDPCCKKQICECDRVATTCFRDNK
AAW92118.1	Cerrophidion_godman	YGKVTDCDPKLDVYTYNEENGVEVCGDDPCCKKQICECDKAAAI CFRDNL
ABG26993.1	Sistrurus_catenatus	YGKVTDCDPKLDYTYTYSENGEIIICGGDDPCCKKQICECDKAAAI CFRDNL
AAW92121.1	Trimeresurus_gracil	YGKATGCDPKKDVTYTYSENGDIVCGDDPCRKQICECDKAAAI CFRDNL
AAM80563.1	Crotalus_viridis_vi	YGKVTDCNPKTASYTYSENGEIVCGDDPCCKKQICECDRVAAI CFRDNI
AAM80565.1	Crotalus_viridis_vi	YGKVTDCNPKTASYTYSENGEIVCGDDPCCKKQICECDRVAAI CFRDNI
AAS79431.1	Sistrurus_catenatus	YAKLTGCDPIDVYTYRQEDGIVCGGEDPCGTQICECDKAAAI CFRDNL
BAA08383.1	Ovophis_okinavensis	YGKVTGCDNPKTASYTYSENGEIVCGDDPCCKKQICECDRVAAI CFRDNI
BAA01568.1	Trimeresurus_flavov	YGKVTGCDPKDDFYTYSENGDIVCGDDPCCKKQICECDKAAAI CFRDNL
AAP48897.1	Viridovipera_stejne	YGKVTGCDPKDDFYTYSENGEIVCGDDPCCKKQICECDKAAAI CFRDNL
AAW92117.1	Bothriechis_schlege	YGKVTGCDPKDDFYTYSENGEIVCGDDPCCKKQICECDKAAAI CFRDNL
AAB71849.1	Gloydus_halys	YGKVTGCDPKDDFYTYSENGEIVCGDDPCCKKQICECDKAAAI CFRDNI
ADB77855.1	Lachesis_muta	YGKVTGCDPKDDFYTYSENGEIVCGDDPCCKKQICECDKAAAI CFRDNL
AAP48894.1	Viridovipera_stejne	YKKLTDGCDPIKDRYSYSWNKAIVCGEDNCPCKEMCECDKAAAI CFRDNL
BAA06553.1	Trimeresurus_gramin	YKKLTDGCDPIKDRYSYSWNKAIVCGEDNCPCKEMCECDKAAAI CFRDNL
AAP48892.1	Viridovipera_stejne	YKKLTDGCDPIKDRYSYSWNKAIVCGEDNCPCKEMCECDKAAAI CFRDNL
* * . * . * * . : * : : * * * * : * * :		
BpPLA2-TXI		DTYEN-KYWFSPAKNCQEESEPC
ABC96692.1	Bothrops_erythromel	DTYDN-KYWFSPAKNCQEESEPC
AAO27454.1	Bothrops_jararacuss	RTYKK-RYMAYPDVLCKPAEKC
AAR14163.1	Sistrurus_catenatus	STYKK-RYMFYPDFLCTDPSETC
BAC02719.1	Trimeresurus_flavov	KTYKK-RYMTFPDIFCTDPTEKC
AAN37410.1	Bothrops_jararacuss	DTYDI-KYWFYGAKNQCEKSEPC
AAM09694.1	Bothrops_insularis	DTYDM-KYWLYGAKNCQEESEPC
AAW92118.1	Cerrophidion_godman	DTYDWKTYWRFPEKCREESEPC
ABG26993.1	Sistrurus_catenatus	NTYNN-KYWRPTENCQEEPEPC
AAW92121.1	Trimeresurus_gracil	DTYNSKTYWMFPAKNCQEESEPC
AAM80563.1	Crotalus_viridis_vi	PSYDN-KYIQFPAKNCQEKPEPC
AAM80565.1	Crotalus_viridis_vi	PSYDN-KYIQFPAKNCQEKPEPC
AAS79431.1	Sistrurus_catenatus	DTYNH-KYWRFSLENCQGESQPC
BAA08383.1	Ovophis_okinavensis	DTYNSKTYWMFPAKNCLEESEPC
BAA01568.1	Trimeresurus_flavov	DTYQN-KYWFYPAKNCQEESEPC
AAP48897.1	Viridovipera_stejne	DTYDN-KYWFSPAKNCQEESEPC
AAW92117.1	Bothriechis_schlege	DTYDN-KYWFYPAKYCQEESEPC
AAB71849.1	Gloydus_halys	DTYDN-KYWFSPAKNCQEESEPC
ADB77855.1	Lachesis_muta	DTYDN-KYWFPRKYCKEESEPC
AAP48894.1	Viridovipera_stejne	DTYDK-KKKINLKL FCKKTSEQC
BAA06553.1	Trimeresurus_gramin	DTYDK-KKKINLKL FCKKTSEQC
AAP48892.1	Viridovipera_stejne	DTYDK-KKKINLKL FCKKTSEQC
: * . *		

Figura 5: Análise comparativa da sequência primária de aminoácidos da proteína madura BpPLA₂-TXI. Foi realizado o alinhamento com outras PLA₂s (ácidas e básicas; D49 e K49) de serpentes da família Viperidae. Em cinza estão marcados os resíduos de cisteína. O símbolo (*) representa resíduos de aminoácidos conservados em todas as sequências analisadas. O hífen representa gaps introduzidos nas sequências para maximizar o alinhamento.

3.3 Análises Filogenéticas

A árvore filogenética foi construída utilizando múltiplos alinhamentos com outras PLA₂ ácidas, com a inclusão de algumas básicas. Foram utilizadas 21 sequências com maior similaridade com a BpPLA₂-TXI obtidas do BLASTX (**Figura 6**). A árvore demonstra que a BpPLA₂-TXI forma um clado com a BE-I-PLA₂ de *Bothrops erythromelas*, e um grupo com outras PLA₂ ácidas, tendo maior proximidade evolucionária com as D49.

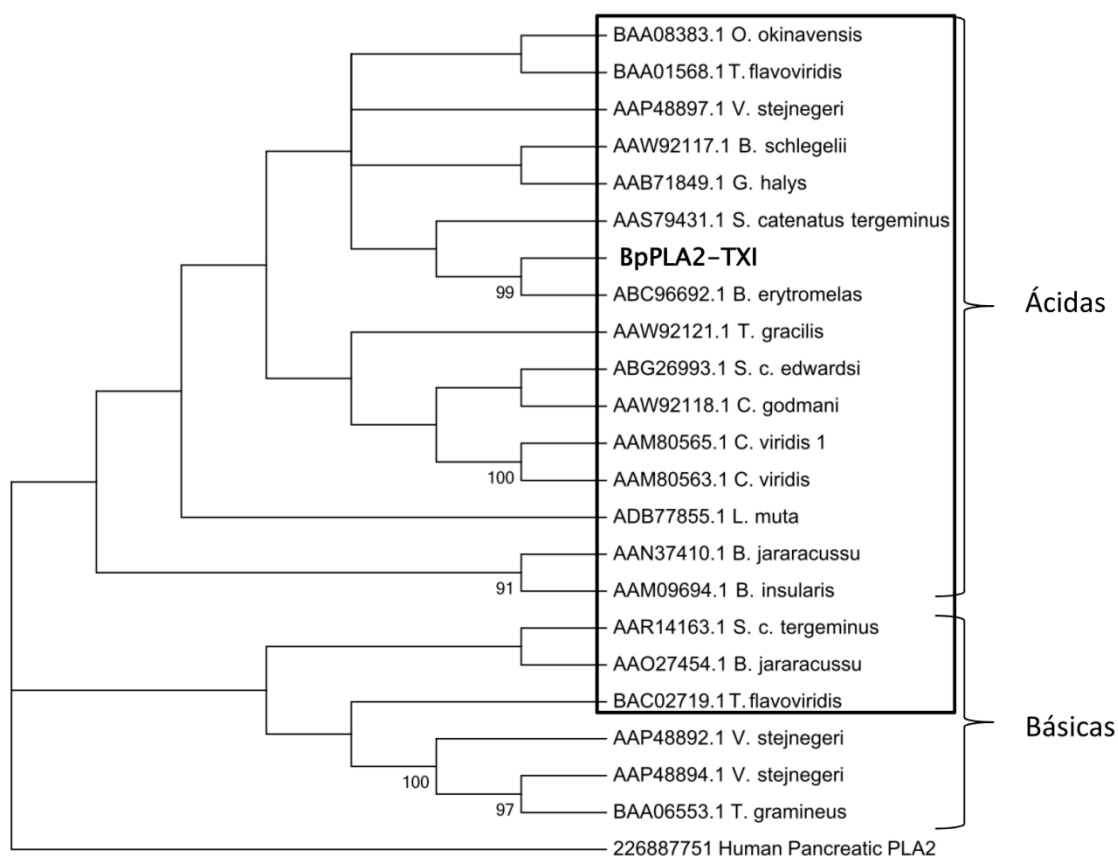


Figura 6: Análise filogenética molecular da sequência deduzida da BpPLA₂-TXI com outras sequências similares de PLA₂ depositadas no *GenBank* (BLASTX) pelo método neighbor-joining, usando o programa MEGA4. Foram consideradas as sequências das proteínas na forma madura. Dentro do quadro estão as PLA₂ D49 e as outras são K49. Como *outgroup* foi incluída a sequência de uma PLA₂ de pâncreas humano (*Human Pancreatic PLA2*).

3.4 Ensaios enzimáticos e farmacológicos

3.4.1 Atividade PLA₂ e inibição da agregação plaquetária

A BpPLA₂-TXI se mostrou estável quando submetida à variação de temperatura (4 a 60°C), porém, quando submetida a uma temperatura de 100°C a atividade diminuiu cerca de 46% (**Figura 7A**). Esta PLA₂ também possui uma estabilidade considerável em diferentes faixas de pH, ocorrendo uma diminuição gradual da atividade quando submetida à pHs 3.5 a 11.0 (**Figura 7B**).

A PLA₂ BpPLA₂-TXI foi capaz de inibir a agregação plaquetária (plaquetas lavadas) de forma concentração dependente quando utilizados colágeno e ADP como agonistas. A toxina quando incubada com as plaquetas por 10 minutos se mostrou mais eficiente em inibir a agregação plaquetária induzida pelo colágeno quando comparado ao ADP (**Figura 8**). A PLA₂ não foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico e epinefrina (dados não mostrados).

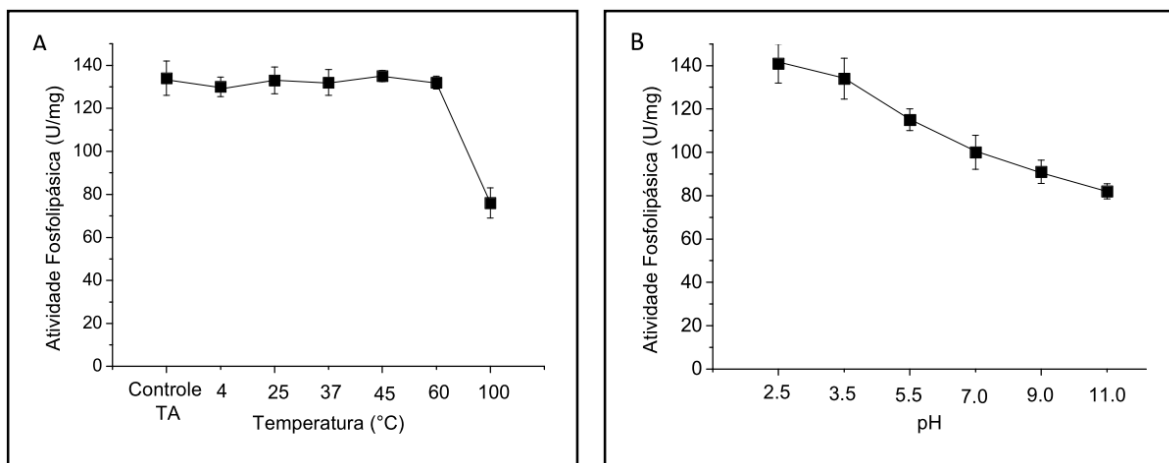


Figura 7: Perfil de estabilidade enzimática da BpPLA₂-TXI. **A)** Atividade fosfolipásica da BpPLA₂-TXI em diferentes temperaturas (4 a 100°C); **B)** Atividade fosfolipásica da BpPLA₂-TXI em diferentes pHs (2.5 a 11.0). Os valores foram mostrados como a média $\pm$ DP (n=3).

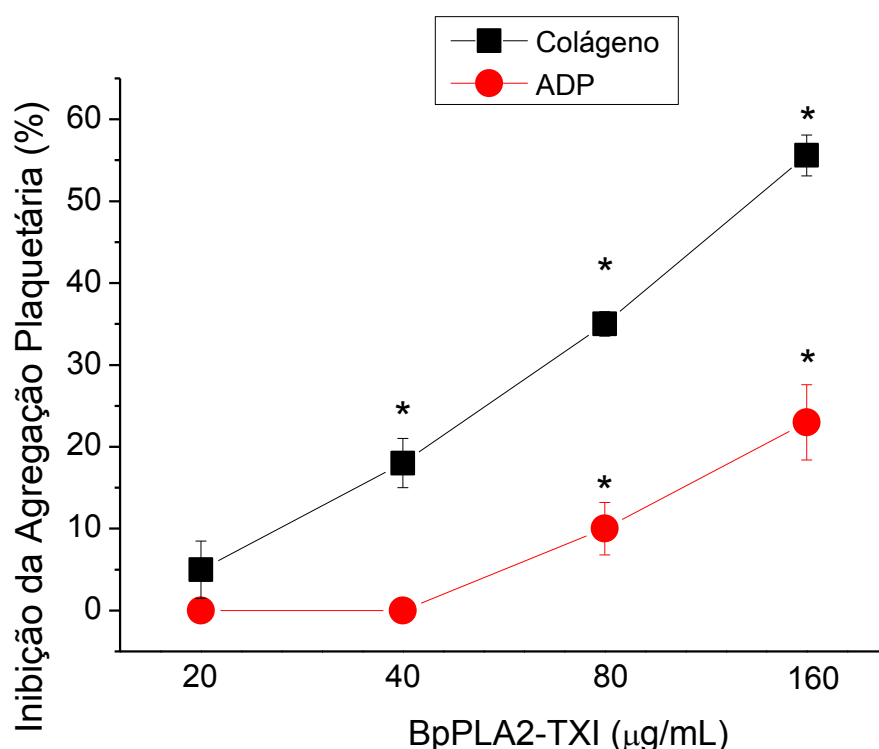


Figura 8: Inibição da agregação plaquetária (plaquetas lavadas) pela BpPLA₂-TXI induzida por colágeno ou ADP. A agregação plaquetária máxima foi atingida após 10 minutos da adição dos agonistas. As amostras foram incubadas previamente com as plaquetas por 10 minutos a 37°C e posteriormente foi adicionado o agonista. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição da agregação plaquetária (média ± DP, n=3). (*) Resultados estatisticamente significativos com valores P <0,001 e >0,1.

3.4.2. Atividade edematogênica

A administração intradérmica (subplantar) de BpPLA₂-TXI foi capaz de induzir edema, como mostra a **Figura 9**. O pico de indução do edema ocorreu 3 horas após a administração da toxina, sendo completamente revertido 24 horas após a inoculação da toxina.

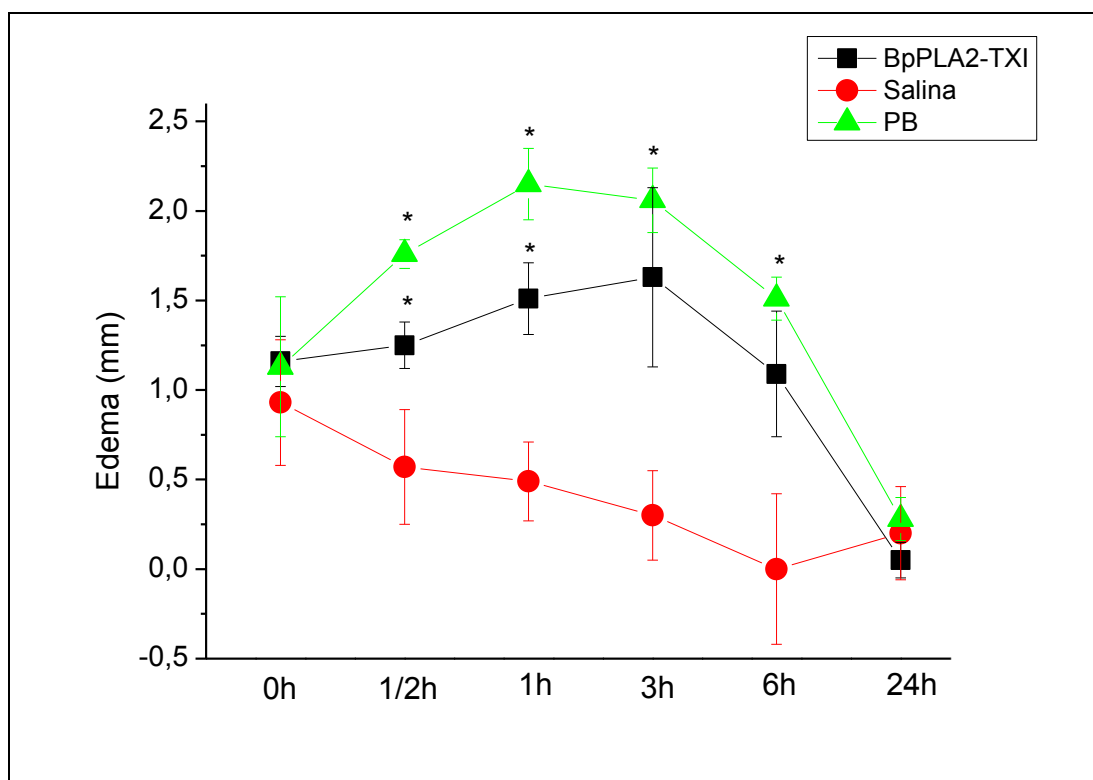


Figura 9: Indução de edema tempo-dependente em pata de camundongos foi medida após a injeção de 20 µg/50µL de peçonha bruta (PB) de *Bothropoides pauloensis* ou de BpPLA₂-TXI. O aumento da área da pata foi medido com um paquímetro e expressa em mm de edema induzido. Os resultados foram apresentados pela média ± DP (n=3). (*) Resultados estatisticamente significativos com valores P <0,001 e >0,1, com relação ao controle.

3.4.3 Atividade miotóxica

A atividade miotóxica foi realizada por dosagem dos níveis plasmáticos de creatina cinase no soro de animais inoculados com 20 µg da PB de *Bothropoides pauloensis*, BpPLA₂-TXI ou PLA₂ BnSP-7. A toxina BpPLA₂-TXI mostrou miotoxicidade (1.260 U/L) quando comparado ao controle (salina), porém, quando comparado com a PB (1.414 U/L) e a miotoxina BnSP-7 (Lys49) (1.925 U/L), sua toxicidade foi menor (**Figura 10**).

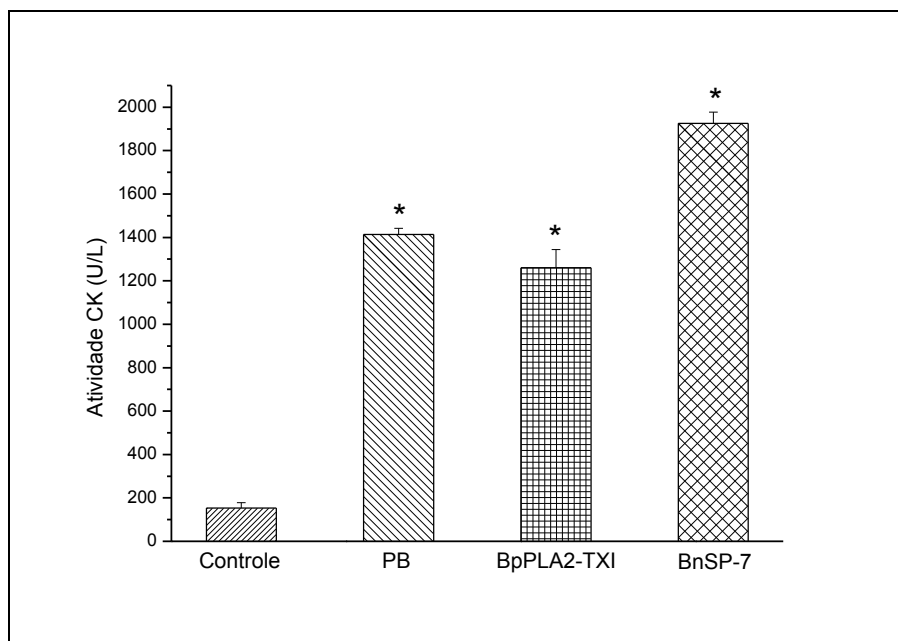


Figura 10: Níveis de creatina cinase (CK) obtido do soro de camundongos injetados com 20 µg de PB de *Bothropoides pauloensis*, BpPLA₂-TXI ou BnSP-7 no músculo gastrocnêmio. Os animais foram sacrificados 3 horas após a injeção. Animais injetados com 50 µL de salina foram utilizados como controle. A atividade foi expressa em U/L. Os resultados foram apresentados pela média ± DP (n=3). (*) Resultados estatisticamente significativos com valores P <0,001 e >0,1, com relação ao controle.

3.5 Atividade citotóxica sobre células tumorais

A PLA₂ BpPLA₂-TXI mostrou baixa ou nenhuma atividade citotóxica sobre as linhagens tumorais MEF (Mouse Embryonic Fibroblast), Sarcoma 180 (TIB-66), TG-180 (CCRF S 180 II) e Carcinoma de ovário (OVCAR-3) (resultados não mostrados).

4.0 Discussão

A peçonha das serpentes é composta por uma variedade de componentes que podem ou não apresentar toxicidade. Muitos trabalhos direcionam seus esforços no isolamento e caracterização funcional e estrutural de proteínas e peptídeos ativos das peçonhas no intuito de elucidar os mecanismos de ação e os efeitos farmacológicos destes constituintes, visando uma aplicabilidade na medicina.

Dentre estes constituintes, as fosfolipases A₂ são um dos principais componentes destas peçonhas e são alvos de vários estudos devido à variedade de seus efeitos tóxicos e farmacológicos. Várias PLA₂ já foram isoladas e caracterizadas química e farmacologicamente, além de clonadas e, ainda, tiveram suas estruturas resolvidas por cristalografia de raios-X (DENEGRÍ *et al*, 2010; MODESTO *et al*, 2006; MAGRO *et al*, 2003).

Vários autores utilizam métodos combinados de cromatografia como: gel-filtração, troca iônica, RP-HPLC e afinidade (CUNHA *et al*, 2011; DENEGRÍ *et al*, 2010; SANTOS-FILHO *et al*, 2008; RODRIGUES *et al*, 2007). Neste trabalho realizamos o isolamento, a caracterização química, estrutural e funcional de uma PLA₂ da peçonha de *Bothropoides pauloensis*. O fracionamento da peçonha de *Bothropoides pauloensis* até o isolamento da PLA₂ ácida, consistiu em quatro passos cromatográficos. O fracionamento em CM-Sepharose *Fast Flow* resultou em 6 picos principais, CM1-CM6, (**Figura 1A**). A fração CM1 foi, então, recromatografada em coluna de gel filtração Sephacryl S-300 obtendo-se mais 7 frações, S1-S7, (**Figura 1B**). A fração com atividade fosfolipásica (S4) foi submetida a uma nova cromatografia em HiTrap Q FF resultando em duas frações, Q1 e Q2, das quais apenas Q2 possui atividade fosfolipásica (**Figura 1C**). Esta fração foi aplicada em RP-HPLC, obtendo-se, então, a PLA₂ ácida com excelente grau de pureza (**Figura 1D**), a qual foi denominada BpPLA₂-TXI. O grau de pureza da amostra foi mostrado em PAGE-SDS em condições reduzidas como uma banda simples de aproximadamente 15 kDa (**Figura 1E**).

O peso molecular da enzima foi obtida através de MALDI-TOF sendo 13,6 kDa (Figura 2), dentro da faixa de peso molecular encontrada para as PLA₂ das peçonhas das serpentes, variando de 13 a 18 kDa (KINI *et al*, 2003). Baseado na sequência de aminoácidos deduzida a partir do cDNA, um pI de 4.98 foi calculado, sendo esta enzima, portanto, uma PLA₂ ácida.

A associação dos métodos cromatográficos utilizados no presente trabalho se mostrou bastante eficiente, visto que, conseguimos a toxina purificada, com um rendimento satisfatório e com boa recuperação da atividade fosfolipásica. A toxina representou cerca de 2,6% da peçonha bruta com um fator de purificação de 2,72 e com atividade específica de 142 U/mg, quase 3 vezes maior do que a atividade da PB (**Tabela 1**). Rodrigues *et al* (2007) isolaram e

caracterizaram a BP-PLA₂ ácida da peçonha de *Bothrops pauloensis* (*Bothropoides pauloensis*) e mostraram que esta enzima representa cerca de 2,0% da PB com atividade específica cerca de 10 vezes maior do que a atividade da PB.

A sequência dos primeiros 48 resíduos de aminoácidos da BpPLA₂-TXI foi determinada por degradação de Edman (**Figura 3**), sendo que a sequência completa foi deduzida posteriormente pelo cDNA. A sequência de nucleotídeos do gene da BpPLA₂-TXI possui 417 pares de base, codificando a proteína madura com 122 resíduos de aminoácidos (**Figura 3**). Estes resultados estão de acordo com a literatura para as PLA₂ ácidas, possuindo de 120 a 135 resíduos de aminoácidos e de 400 a 500 pares de bases (FERNÁNDEZ *et al*, 2010; MODESTO *et al*, 2006; ANDRIÃO-ESCARSO *et al*, 2002). A análise da sequência primária da BpPLA₂-TXI mostra que esta enzima contém um resíduo de aspartato na posição 49 (D49), além de vários resíduos conservados (²⁴YGCYCGWGG³²; H⁴⁸), envolvidos no sítio de ligação ao Ca⁺⁺ e no sítio catalítico.

A BpPLA₂-TXI foi alinhada com outras sequências, totais ou parciais, de fosfolipases A₂ já isoladas e caracterizadas da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*) (**Figura 4**). A maior similaridade da BpPLA₂-TXI é com a BP-PLA₂, cerca de 77% (calculado pelo programa Clustal 2.1 Multiple Sequence Alignments), resultado esperado, visto que as duas PLA₂ são Asp49 ácidas.

O alinhamento múltiplo da sequência da BpPLA₂-TXI mostrou grande similaridade com outras PLA₂ D49 ácidas (**Figura 5**) da família Viperidae, sendo que a maior similaridade ocorreu com a BE-I-PLA₂ de *Bothrops erythromelas* (MODESTO *et al*, 2006), com 99% de similaridade (**Figura 6**). A BpPLA₂-TXI mostra vários domínios conservados comuns às PLA₂ D49, incluindo 14 resíduos de cisteína, realizando 7 pontes dissulfeto, além de resíduos envolvidos no sítio de ligação do cálcio e do sítio catalítico (descrito acima). A BpPLA₂-TXI parece ser uma isoforma da miotoxina BP-PLA₂ (RODRIGUES *et al*, 2007), uma PLA₂ ácida isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* (*Bothropoides paauloensis*).

O gene da PLA₂ está envolvido em uma evolução acelerada por substituições em regiões codificantes da proteína e parece ser universal para todos os genes codificantes das PLA₂ nas glândulas de peçonha das serpentes

crotalínicas (GIBBS; ROSSITER, 2008; CHIJIWA *et al*, 2005; CHEN *et al*, 2004; NAKASHIMA *et al*, 1995). Como mostrado na **Figura 6**, a BpPLA₂-TXI junto com outras PLA₂ ácidas formam um grupo separado das PLA₂ básicas, sugerindo que a substituição do resíduo D49 por K49 é uma característica derivada, porém, mais estudos devem ser realizados neste sentido. Tsai *et al* (2003) isolaram e caracterizaram várias PLA₂ de *Crotalus viridis viridis* de diferentes regiões e mostraram que as PLA₂ ácidas estudadas possuíam um resíduo de Glu (E) na posição 6 e que estas toxinas eram capazes de inibir a agregação plaquetária. A BpPLA₂-TXI também possui o resíduo E6 e foi capaz de inibir a agregação plaquetária, como será discutido a seguir. Além disso, ela está mais próxima evolutivamente de outras PLA₂ E6, a saber: (ABC96692.1- BE-I-PLA₂ (MODESTO *et al*, 2006); AAS79431.1), corroborando com os estudos de Tsai *et al* (2003).

A BpPLA₂-TXI, uma PLA₂ ácida isoenzima isolada da peçonha de *B. pauloensis* mostrou uma boa recuperação da atividade fosfolipásica específica (**Tabela I**). Estes resultados estão de acordo com estudos prévios envolvendo PLA₂ de peçonha de serpentes, nos quais as PLA₂ ácidas Asp49 possuem alta atividade catalítica e, ainda, se mostram mais ativas que as PLA₂ Asp49 básicas (TEIXEIRA *et al*, 2011; DENEGRÍ *et al*, 2010; RODRIGUES *et al*, 2007).

A enzima é estável quando submetida a diferentes faixas de temperatura (4 a 60°C), porém, quando submetida a uma temperatura de 100°C por 30 min, a atividade enzimática é reduzida cerca de 46% (**Figura 7A**), sugerindo que a esta temperatura há uma perda de estabilidade da enzima com consequente desnaturação e queda na atividade enzimática.

A estabilidade também foi vista quando a enzima foi submetida a diferentes valores de pH (2.5 a 11.0). Porém, ela se mostra mais ativa em pHs mais baixos, sendo máxima em 2.5, ocorrendo leves reduções na atividade à medida em que os valores de pH vão subindo (**Figura 7B**).

As PLA₂ da peçonha de serpentes são bastantes estáveis devido à grande quantidade de pontes dissulfeto intracadeia presentes em sua estrutura, possuindo 14 resíduos de cisteína, formando 7 pontes dissulfeto, justificando os resultados apresentados.

O tratamento da enzima com EDTA reduziu sua atividade enzimática (resultados não mostrados), corroborando com outros estudos, os quais mostram

que as PLA₂ Asp49 necessitam de um íon bivalente (Ca⁺⁺) como cofator enzimático (TEIXEIRA *et al*, 2011; RODRIGUES *et al*, 2007). No sítio catalítico das PLA₂, um íon Ca⁺⁺ é coordenado pelos resíduos de Asp49, Tyr28, Gly30 e Gly32 com o auxílio de duas moléculas de água (FLEER *et al*, 1981) e, neste caso, a ausência do íon cálcio provoca a entrada de outra molécula de água na posição do íon, mudando a conformação da cadeia lateral do Asp49, afetando a atividade enzimática (MURAKAMI *et al*, 2007).

A BpPLA₂-TXI inibiu a agregação plaquetária (Plaquetas lavadas) induzida por colágeno e ADP (**Figura 8**). Este resultado era esperado, visto que vários outros trabalhos com PLA₂ ácida Asp49 mostram a mesma atividade (TEIXEIRA *et al*, 2011; FERNÁNDEZ *et al*, 2010; RODRIGUES *et al*, 2007). Foi mostrado, ainda, que o peptídeo obtido com base na sequência C-terminal de algumas destas toxinas podem induzir a mesma atividade, é o caso do peptídeo sintético baseado na sequência C-terminal de uma PLA₂ ácida BpirPLA₂-I isolada de *Bothrops pirajai* (TEIXEIRA *et al*, 2011). Estes autores ainda avaliaram outras sequências de peptídeos baseados em outras regiões da mesma toxina e verificaram que estes não produzem este efeito. Isto mostra que a região C-terminal tem papel determinante para esta atividade, mas sem descartar a possibilidade da interferência direta do sítio catalítico nesta atividade, visto que não foi encontrado na literatura PLA₂ K49 que apresentem esta atividade.

A administração intradérmica de BpPLA₂-TXI foi capaz de induzir edema com pico máximo sendo registrado 3h após a aplicação da toxina (**Figura 9**). Já foi mostrada a capacidade das PLA₂ D49 ácidas de provocarem edema (DENEGRÍ *et al*, 2010; SANTOS-FILHO *et al*, 2008; RODRIGUES *et al*, 2007). Vários fatores podem influenciar a indução do edema pelas PLA₂ D49 ácidas. Estas toxinas catalisam a quebra de fosfolípidos liberando ácido araquidônico, que é precursor de eicosanóides, os quais podem mediar a resposta inflamatória e, portanto, induzir o edema (DENNIS, 1997). Porém, alguns trabalhos mostram que esta atividade está intimamente ligada ao resíduo His48, visto que quando estas toxinas são tratadas com Brometo de *p*-bromofenacil (BPB), levando a alquilação do resíduo His48, há uma redução ou abolição desta atividade, não só das PLA₂ D49 ácidas, mas as básicas também são afetadas (TEIXEIRA *et al*, 2011; RODRIGUES *et al*, 2004).

A BpPLA₂-TXI induziu aumentos significativos nos níveis plasmáticos de creatina cinase 3 horas após a injeção da toxina no músculo gastrocnemius de camundongos. Porém, esta indução ainda é bem menor quando comparado com os níveis de creatina cinase induzidos pela BnSP-7, uma PLA₂ K49 básica (**Figura 10**). Apesar da maioria das PLA₂ D49 ácidas não mostrarem miotoxicidade (DENEGRÍ *et al*, 2010; FERNÁNDEZ *et al*, 2010; ANDRIÃO-ESCARSO *et al*, 2002), alguns trabalhos já mostraram que algumas destas toxinas podem lesionar fibras musculares em uma menor extensão (RODRIGUES *et al*, 2007; FULY *et al*, 2003).

O mecanismo pelo qual estas toxinas induzem a miotoxicidade não é bem definido. Alguns trabalhos sugerem que é um mecanismo independente do sítio catalítico, ocorrendo uma perturbação do sarcolema, através da inserção da cauda C-terminal da toxina na membrana, levando a um influxo de cálcio e à consequente necrose muscular (GUTIERREZ; OWNBY, 2003). Porém, outros autores que realizaram a modificação das fosfolipases A₂ com BPB, observaram a perda ou diminuição da miotoxicidade da toxina (FULY *et al*, 2003), sugerindo que a miotoxicidade das PLA₂ D49 ácidas, está diretamente relacionada com o sítio catalítico.

Foi testada a ação da BpPLA₂-TXI sobre algumas linhagens de células tumorais: MEF (Mouse Embryonic Fibroblast), Sarcoma 180 (TIB-66), TG-180 (CCRF S 180 II) e Carcinoma de ovário (OVCAR-3). A BpPLA₂-TXI possui baixa atividade citotóxica sobre as linhagens TG-180 (CCRF S 180 II) e Carcinoma de ovário (OVCAR-3) e não mostrou atividade sobre as linhagens MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) e Sarcoma 180 (TIB-66) (dados não mostrados). Vários autores mostraram que algumas PLA₂ da peçonha de serpentes possuem alta atividade citotóxica sobre determinadas linhagens tumorais (COSTA *et al*, 2008; STABELI *et al*, 2006), porém estas toxinas geralmente são PLA₂ básicas. Alguns autores mostraram que as PLA₂ ácidas possuem baixa ou nenhuma atividade citotóxica (TEIXEIRA *et al*, 2011; FERNÁNDEZ *et al*, 2010). A citotoxicidade das PLA₂ está diretamente relacionada com a região C-terminal da toxina, sendo que peptídeos sintetizados com base na sequência C-terminal podem induzir os mesmos efeitos. Porém, a maioria dos peptídeos citotóxicos possui características catiônicas e são altamente hidrofóbicos. O peptídeo C-terminal (últimos 15

resíduos de aminoácidos) da BpPLA₂-TXI possui característica aniônica, o que pode ser uma justificativa para os resultados encontrados.

5.0 Conclusão

Neste trabalho foi isolada uma PLA₂ ácida D49 da peçonha de *Bothropoides pauloensis*, denominada BpPLA₂-TXI. Esta proteína é uma miotoxina com alta atividade catalítica, além de ser um inibidor de agregação plaquetária. A BpPLA₂-TXI possui grande similaridade com outras PLA₂ ácidas, em especial com as D49 e E6, formando um grupo separado das PLA₂ básicas. Estudos na área de purificação e caracterização estrutural e funcional de PLA₂s animais abrem perspectivas para a utilização das mesmas como modelos moleculares para a síntese de novos agentes farmacêuticos, bem como para melhorar o entendimento de algumas doenças.

6.0 Referências Bibliográficas

AGERO, U.; ARANTES, R. M. E.; LACERDA-QUEIROZ, N.; MESQUITA, O. N.; MAGALHÃES, A.; SANCHEZ, E. F.; CARVALHO-TAVARES, J. Effect of Mutalysin II on Vascular Recanalization after Thrombosis Induction in the Ear of the Hairless Mice Model. **Toxicon**, v. 50, p. 698-706, 2007.

ALBUQUERQUE, N. H.; COSTA, T. B. G.; CAVALCANTI, M. L. F. Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* notificados no estado da Paraíba. **Rev. de Biol. e Ciên. da Terra**, v. 5, n. 1, 1º sem., 2004.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; FONTES, 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, p. 723-732, 2002.

ARAYA, C.; LOMONTE, B. Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A₂ homologues of snake venoms. **Cell Biology International**, v. 31, p. 263-268, 2007.

BAZAA, A.; LUIS, J.; SRAIRI-ABID, N.; KELLECH-ZIRI, O.; KESSENTINI-ZOUARI, R.; DEFILLES, C.; LISSITZKY, J. C.; AYEB, M. E.; MARRAKCHI, N. MVL-PLA₂, a phospholipase A₂ from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. **Matrix Biology**, v. 28, p. 188-193, 2009.

BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, p.325-372, 1994.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL, Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: < **portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_aap.pdf**>. Acessado em 04/2011.

CHEN, Y.H.; WANG, Y.M.; HSEU, M.J.; HSEU, M.J.; TSAI, I.H. Molecular evolution and structure-activity relationships of crotoxin-B like asparagin 6 phospholipase A2 in pit viper venoms. **Biochem. J.**, v. 381, p. 61–73, 2004.

CHIJIWA, T.; TOKUNAGA, E.; IKEDA, R.; TERADA, K.; OGAWA, T.; ODA-UEDA, N.; HATTORI, S.; NOZAKI, M.; OHNO, M. Discovery of novel [Arg49] phospholipase A2 isozymes from *Protobothrops elegans* venom and regional evolution of Crotalinae snake venom phospholipase A2 isozymes in the southwestern islands of Japan and Taiwan. **Toxicon**, v. 48, p. 672-682, 2006.

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

CUNHA, K. C. S.; FULY, A. L.; ARAÚJO, E. G. A phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* snake venom increases the survival of retinal ganglion cells *in vitro*. **Toxicon**, v. 57, p. 580-585, 2011.

DE-HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M.; NIEUWENHUIAEN, W.; VAN DEENEN, L. L. M. Purification and properties of phospholipase a from porcine pancreas. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 159, p. 103-117, 1968.

DENEGRI, M. E. G.; ACOSTA, O. C.; HUANCAHUIRE-VEJA, S.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S.; MARUNAK, S. L.; TEIBLER. G. P.; LEIVA, L. C.; PONCE-SOTO, L. A. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba Spll RP4 of the *Bothrops alternates* snake venom from Argentina. **Toxicon**, vol. 56, p. 64-74, 2010.

DENNIS, E. A. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. **TiBS**, v. 22, p. 1-2, 1997.

DESSEN, A. Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A₂. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 40-47, 2000.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET Jr., R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, p. 617-640, 2009.

FERNÁNDEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M.; ÂNGULO, Y.; SANZ, L.; JUÁREZ, P.; CALVETE, J. J.; LOMONTE, B. Isolation of na acidic phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: Biochemical and toxicological characterization. **Biochimie**, v. 92, p. 273-283, 2010.

FERREIRA, S. H.; ROCHA-E-SILVA, M. Potenciation of bradykinin and eledoisin by BPF (Bradykinin Potentiating Factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia**, vol. 21, p. 347-349, 1965.

FLEER, E. A. M.; VERHEIJ, H. M.; DE HAAS, G. H. Modification on carboxilate groups in bovine pancreatic phospholipase A₂. **Europ. Journal Biochem**, v. 113, p. 283-288, 1981.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; CARLINI, C. R. and GUIMARAES, J. A. *Bothrops* sp. snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. **Comp. Biochem. Physiol**, vol. 119c, p. 21-29, 1998.

FREITAS, M. A.; GENO, P. W.; SUMMER, L. W.; COOKE, M. E.; HUDIBURG, S. A.; OWNBY, C. L.; KAISER, I. I.; ODELL, G. V. Citrate is a major component of snake venoms. **Toxicon**, v. 30, p. 461-464, 1992.

FULY, A. L.; CALIL-ELIAS, S.; MARTINEZ, A. M.; MELO, P. A.; GUIMARÃES, J. A. Miototoxicity induced by na acidc Asp-49 phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. Comparison with lysophosphatidylcholine. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 35, p. 1470-1481, 2003.

FULY, A. L.; MACHADO, O. L. T.; ALVES, E. W.; CARLINI, C. R. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Thromb. Haemost.**, v. 78, p. 1372-1380, 1997.

GIBBS, H. L.; ROSSITER, W. Rapid evolution by positive selection and gene gain and loss: PLA₂ venom genes in closely related *Sistrurus* rattlesnakes with divergent diets. **Journal of Molecular Evolution**, v. 66, p. 151-166, 2008.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, p. 915–931, 2003.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; SILVA, N. de; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; AVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; SILVA, H. J. de. The global burden of snakebite: a literature

analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Medicine**, v. 5, p. 01-14, 2008.

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

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**. v. 42(8), p. 827-840, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEONARDI, A.; FOX, J. W.; TRAMPUS-BAKIJA, A.; KRIZAJ, I. Ammodytase, a Metalloproteinase from *Vipera Ammodytes Ammodytes* Venom, Possesses Strong Fibrinolytic Activity. **Toxicon**. v. 49, p. 833-842, 2006.

MAGRO, A. J.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem. And Biophys. Res. Com. (BBRC)**, vol. 311, p. 713-720, 2003.

MASUDA, S.; MURAKAMI, M.; ISHIKAWA, Y.; ISHII, T.; KUDO, I. Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A₂ enzymes in several human tissues. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1736, p. 200-210, 2005.

MODESTO, J. C. A.; SPENCER, P. J.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R. C.; OLIVA, M. L.; 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, p. 377-384, 2006.

MOLL, S.; KENYON, P.; BERTOLI, L.; DE MAIO, J.; HOMESLEY, H.; DEITCHER, S. R. Phase II Trial of Alfimeprase, a Novel-Acting Fibrin Degradation Agent, for Occluded Central Venous Access Devices. **Journal Of Clinical Oncology**, v. 24, n. 19, p. 3056-3060, 2006.

MURAKAMI, M. T.; VIÇOTI, M. M.; ABREGO, J. R. B.; LOURENZONI, M. R.; CINTRA, A. C. O.; ARRUDA, E. Z.; TOMAZ, M. A.; MELO, P. A.; ARNI, R. K. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues. **Toxicon**, v. 49, p. 378-387, 2007.

NAKASHIMA, K.; NOBUHISA, I.; DESHIMARU, M.; NAKAI, M.; OGAWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; HATTORI, S.; OHNO, M. Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in

crotalinae snake venom gland phospholipase A2 isozyme genes. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 92, 5605–5609, 1995.

OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, vol. 37, p. 411-445, 1999.

RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKKISTRA, B.W.; DRENT, J.; SIGLER, P.B. A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus utrox* venom. **J. biol. Chem.**, v. 260, p. 11627-11636, 1985.

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. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, p. 153-165, 2007.

RODRIGUES, R. S. Purificação e caracterização de uma nova Fosfolipase A₂ ácida da peçonha de *Bothrops pauloensis*. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica). Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

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(1), p. 305-314, 2004.

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.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 908-917, 2008.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The Expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1488, p. 1-19, 2000.

SOUZA, J. R. F.; MONTEIRO, R. Q.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. **Toxicon**, v. 39, p. 787-792, 2001.

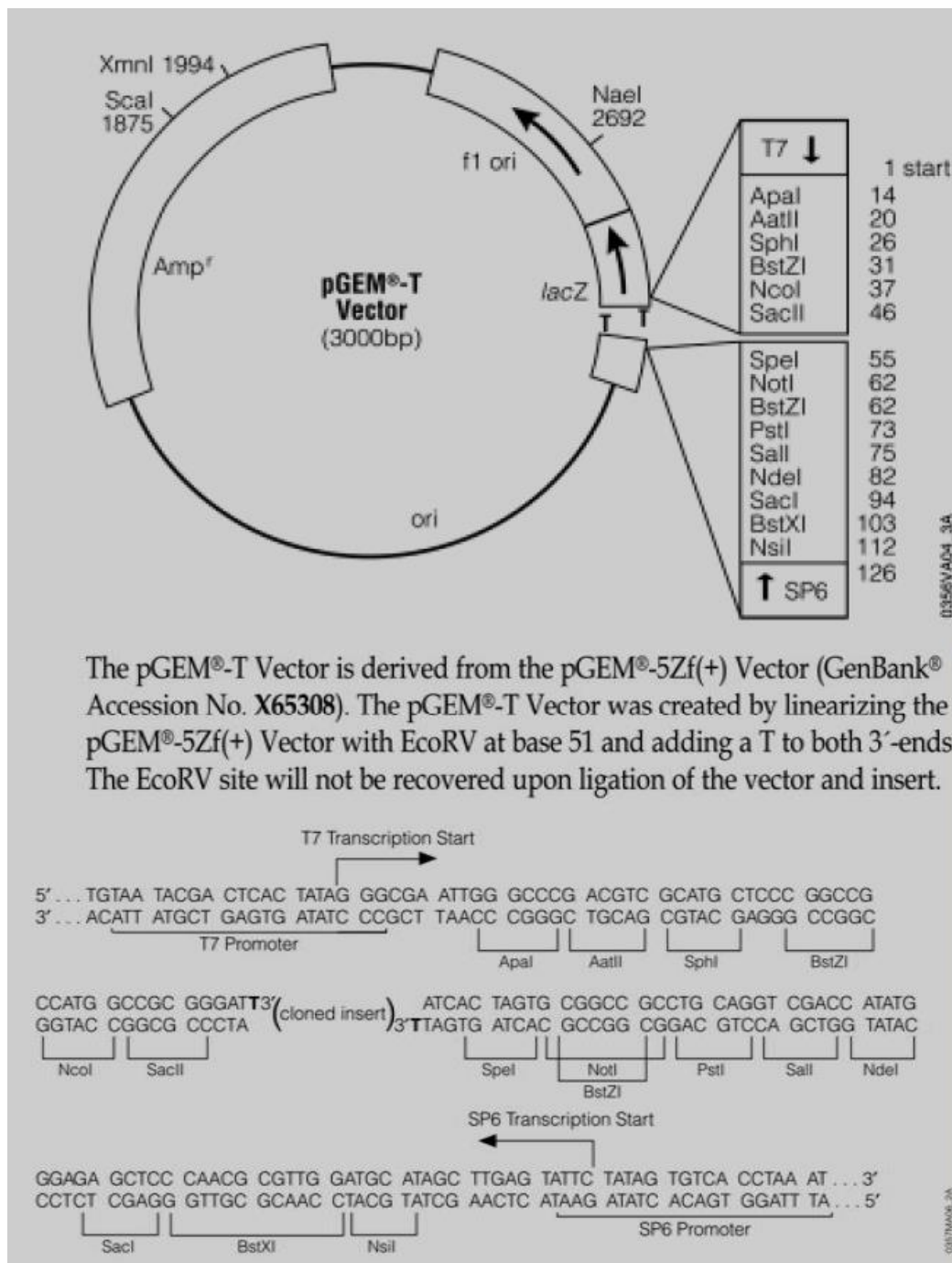
STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M.; SOARES, A. M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys-49-phospholipase A₂ homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 142, p. 371-381, 2006.

TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; SILVA, F. M. N.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SILVA-Jr, F. P.; IZIDORO, L. F. M.; FULY, A. L.; JULIANO, M. A.; SANTOS, C. R.; MURAKAMI, M. T.; SAMPAIO, S. V.; SILVA, S. L.; SOARES, A. M. Molecular characterization of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom: Synthetic-peptide identifies its anti-platelet region. **Archives of Toxicology**, *In press*, 2011.

TSAI, I. H.; CHEN, Y. H.; WANG, Y. M.; TU, A. T. Geographic variations, cloning and functional analyses of the venom acidic phospholipases A₂ of *Crotalus viridis viridis*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 411, p. 289–296, 2003.

WARRELL, D. A. Snake bite. **Lancet**, v. 375, p. 77-88, 2010.

Anexo I



Mapa do vetor pGEM-T-easy (Promega) usado para clonar o gene da PLA₂ ácida, BpPLA₂-TXI, da peçonha de *Bothropoides pauloensis*.