

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA
FOSFOLIPASE A₂ ÁCIDA DA PEÇONHA DE *Bothrops*
pauloensis

Renata Santos Rodrigues

Orientadora: Prof^a Dr^a Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

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

**UBERLÂNDIA-MG
2006**

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA
FOSFOLIPASE A₂ ÁCIDA DA PEÇONHA DE *Bothrops*
pauloensis

Renata Santos Rodrigues

Orientadora: Prof^a Dr^a Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

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

**UBERLÂNDIA-MG
2006**

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA
FOSFOLIPASE A₂ ÁCIDA DA PEÇONHA DE *Bothrops*
pauloensis

Renata Santos Rodrigues

Comissão Examinadora:

Presidente: Prof^a Dr^a Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Examinadores: Prof^o Dr^o Luiz Ricardo Goulart

Prof^o Dr^o Andreimar Martins Soares

Data da defesa: 28/02/2006

**As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o
formato da Dissertação forma contempladas.**

(Orientadora)

Uberlândia, __/__/__

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: Maria Emília e José Rodrigues pelo amor, carinho, dedicação e educação.

Não tenho palavras para agradecer os momentos de incentivo e apoio dado a todos os 4 anos que tentei entrar no mestrado e hoje posso dizer que realizei meu sonho graças à vocês.

Aos todos os meus tios, tias e primos, pelo apoio, incentivo e saudável convivência durante todos estes anos, em especial a minha tia Mariângela, pessoa que me espelha e que muito admiro pelo seu caráter e sua persistência em seus sonhos tornando-os realidade.

Aos meus irmãos: Júnior, Tarcília e Mário Eugênio pela convivência e apoio em todas as etapas de minha vida acadêmica, minha eterna gratidão e admiração.

À Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

pela perfeita orientação e dedicação. Obrigada pela convivência, pelos ensinamentos, pelos “puxões de orelha” e por todos os momentos que nos fizeram crescer juntas tanto na formação científica quanto no crescimento pessoal. Obrigada por confiar em mim desde o início e me fazer ter o privilégio de ser sua primeira orientada oficial, certamente você é um exemplo de orientadora não só para mim como para todos os alunos do nosso laboratório. Meus sinceros agradecimentos e minha grande admiração e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo que sou e tudo que tenho. Pelos momentos de desespero que Ele me atendia e eu conseguia solucionar meus problemas.

À Dra Maria Inês Homsí Brandeburgo, por ser a primeira orientadora na minha vida, por me introduzir no mundo da pesquisa de maneira brilhante, por todos estes anos de convivência e festas.

À Dra Amélia Hamaguchi, pelos momentos de conversas demoradas sobre vários assuntos, seja profissional ou pessoal, com certeza acrescentou muito na minha vida e no meu ser.

À Dra Hérica Lima, o pouco tempo de convivência nos fez muito próximas, hoje vejo que ganhamos com sua chegada e tenho certeza que essa parceria será muito produtiva.

À Dra Tânia (Patologia), obrigada pela paciência na confecção e interpretação das lâminas histológicas e pela perfeita orientação nesta área que pouco sabíamos.

À Dr Andreimar Martins Soares, pessoa que aprendi a admirar mesmo a distância, que aprendi muito no tempo em que fiquei no seu laboratório e que me proporcionou um agradável convívio juntamente com seus orientados: Carol, Silvana, Juliana, Rafael e Vanessa, meus sinceros agradecimentos e gratidão

À Dra Heloísa Selistre por me receber de braços abertos durante minha estadia em São Carlos, a fim de utilizar o HPLC e o sequenciador, só tenho a agradecer o ótimo ambiente e o bom convívio com suas orientadas: Carmen e Juliana.

Ao meu Amigo Luiz Fernando, pessoa que tenho grande admiração e que me ensinou muitas coisas no laboratório, obrigada pelas conversas e mesmo pelos momentos de desentendimentos que me fizeram ver o quão importante você é na minha vida.

À minha Amiga Johara, pessoa cativante que acabou cativando a todos a sua volta, obrigada pela ajuda na realização dos experimentos, pelo convívio familiar que tive tanto na casa de Uberlândia quanto na casa de Ribeirão Preto, obrigada por me fazer conhecer uma família (Boldrini França) muito divertida e uma mãe que é uma Super Mãe. Te agradeço pelo ombro que me cedeste nos momentos de angústia e pelo lindo sorriso nos momentos de alegria, falar de você é muito fácil, pois aqui esta um ser humano em que as qualidades se sobresaem aos pouquíssimos defeitos, “pra falar verdade, os defeitos não

preenchem os 5 dedos da mão”. Você caiu do céu na minha vida e hoje se faz presente em todos os momentos. Agradeço a Deus todas as noites pela sua existência, Amo Você!!!!

Às amigas Cristiani Baldo e Carla Menezes, com quem convivi grande parte da minha vida laboratorial, com quem aprendi muitas coisas e que me fizeram enxergar como uma amizade é importante para um bom convívio profissional, obrigada pelas alegrias e tristezas que vivemos juntas, pelas noites de farra e festa que tivemos e pelos momentos de hospedagem, passando noites acordadas para simplesmente fofocar e rir muito.

À minha amiga Marília, pessoa que admiro muito com sua maneira meiga, versátil e alegre de viver a vida, obrigada pelas noites de baladas, pelas festas divertidas, pelas tortas e pelo ombro amigo. Você faz parte da minha vida de maneira muito especial.

À Carol e Daiana, essa dupla perfeita tanto na área profissional quanto na área pessoal, nosso laboratório só veio ganhar com a chegada destas duas meninas alegres, companheiras e sempre dispostas a ajudar em todos os momentos, obrigada pelas escalas perfeitas no LÉA, pelas ajudas no repique e pela responsabilidade depositada em experimentos do grupo. Vocês terão um futuro brilhante!!!!

À Mirian pela agradável convivência em todos estes anos e pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao me amigo Fábio Lucas e Luis Henrique pessoas que aprendi a respeitar e acreditar em todos os seus propósitos, obrigada pela ótima convivência, pelas festas e pela ajuda em alguns experimentos, vocês fazem parte de uma grande história da minha vida.

Aos amigos do laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais: Luciana, Danilo, Mário, Luiz Carlos, Leonardo.

Aos antigos: Willian, Rodrigo, Gilvan, André, Elisângela pelos momentos de descontração que passamos juntos tanto dentro quanto fora do laboratório.

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular: Juliana, Fausto, Carlos, Guilherme, Paula, Paula (Cindy), Karla, Ana Paula, Sílvia, Rone.

À amiga Andréia, meu porto seguro em todos os momentos da minha vida, sem você eu não saberia responder a muitos questionamentos que me foram colocados, sem você eu não aprenderia a dar mais valor em amizade e com você aprendi que as pequenas coisas são

fundamentais para nosso crescimento pessoal e profissional. Deus colocou você em minha vida não foi por acaso e apesar de nossas brigas, acredito que tudo isso que acontece conosco, só nos faz fortalecer os laços de amizade. Você é muito especial e hoje acredito não conseguir viver sem a sua presença na minha vida. Amo Você.

Aos amigos do laboratório de Genética do Comportamento: Cynara, Luciana, Carol, Tininha, Carlos, Daniela, Camila, Flávia.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica: Rogério, Gabriel, Decivaldo, Hugo, Vinícius, Leonardo, Anibal, Clara, pela convivência e pelas noites de buteco nos “Quincas”.

Ao Jonh Pietro (Hemocentro Regional de Uberlândia- Fundação Hemominas) por ter me auxiliado nos testes de agregação plaquetária.

Aos funcionários Tianinha, D. Nenzinha e Cleuber, pela disposição em ajudar em tudo.

À Marlene, pessoa que aprendi a admirar e que sempre “ quebrou meu galho “ nos momentos de aperto do nosso laboratório.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao Instituto Valeé e Pentapharm do Brasil pelo fornecimento de animais para os ensaios biológicos

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

“Ainda que eu tivesse o dom da profecia, o conhecimento de todos os mistérios e de toda ciência; ainda que eu tivesse toda fé, a ponto de transpor montanhas, se eu não tivesse o amor, eu nada seria”.

(Coríntios 13, 2)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação da Prof^a Dr^a Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.

As análises morfológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Sumário

Lista de Abreviaturas	xv
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Figuras	xviii
1-Introdução Geral	02
2-Objetivos	14
2.1-Objetivos Gerais	15
3-Referências Bibliográficas	16
4- Capítulo Único: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA FOSFOLIPASE A₂ ÁCIDA DA PEÇONHA DE <i>Bothrops pauloensis</i>	28
5- Introdução	31
6- Materiais e Métodos	34
6.1- Obtenção da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i> e dos animais	34
6.2- Fracionamento da Peçonha Bruta de <i>Bothrops pauloensis</i> e obtenção da fosfolipase A ₂	34
6.3- Determinação quantitativa de proteínas	36

6.4- Caracterização Química.	36
6.4.1- Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)	36
6.4.2- Seqüência N-terminal	37
6.4.3-Focalização Isoelétrica	37
6.5- Caracterização Enzimática	
6.5.1-Atividade Fosfolipásica	39
6.5.2-Atividade Hemolítica Indireta	40
6.5.3- Teste de Inibição da Agregação Plaquetária	40
6.6- Caracterização Biológica.	41
6.6.1-Atividade Edematogênica	41
6.6.2- Análise Miotóxica por Dosagem de Creatina Cinase no Plasma	41
6.6.3-Análise Morfológica	42
6.7-Análise Estatística	43
7- Resultados	44

7.1-Cromatografia de Troca-ionica em gel de CM-Sepharose Fast Flow	44
7.2-Fracionamento em Gel de Phenyl-Sepharose CL-4B da fração CM1 da peçonha bruta de <i>Bothrops pauloensis</i>	45
7.3-Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Agentes Desnaturantes	46
7.4-Fracionamento em Coluna de fase reversa C8 Sephasil TM da fração P5 da peçonha bruta de <i>Bothrops pauloensis</i>	47
7.5-Recuperação protéica das frações obtidas nos passos de purificação da fosfolipase BP-PLA ₂ da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>	
7.6- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Agentes Desnaturantes para Determinação da Massa Molecular	50
7.7- Focalização Isoelétrica	51
7.8- Seqüência N-Terminal da BP-PLA ₂ de <i>Bothrops pauloensis</i>	52
7.9- Caracterização Enzimática e Biológica	53
7.9.1- Atividade Fosfolipásica	53
7.9.2- Atividade Hemolítica Indireta	54
7.9.3- Atividade de Agregação Plaquetária	55

7.9.4- Atividade Edematogênica	56
7.9.5- Atividade Miotóxica (CK)	57
7.9.6- Alterações Morfológicas Induzidas pela Peçonha Bruta de <i>Bothrops pauloensis</i> e BP-PLA ₂	58
8- Discussão	62
9- Conclusão	71
10- Referências Bibliográficas	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - adenosina difosfato

ATP - adenosina trifosfato

Bis-acrilamida - N, N' metileno-bis-acrilamida.

BP-PLA₂- fosfolipase A₂ ácida da peçonha de *Bothrops pauloensis*

CK- creatina cinase

CM - grupo carboximetil

HPLC-RP - cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa

i.m- intramuscular

M - Molar

mA- miliâmperes

NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo

NH₄HCO₃ (AMBIC) -tampão bicarbonato de amônio

nm- nanômetros

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

PAGE-SDS - eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

PB - peçonha bruta

PBS - tampão fosfato em salina

pI- ponto isoelétrico

PLA₂- fosfolipase A₂

PM - peso molecular

PRP - plasma rico em plaquetas

PSA - persulfato de amônio

SDS - dodecil sulfato de sódio

TEMED - N, N, N', N “, -tetrametiletileno diamino”.

TFA - ácido trifluoracético

Tris - Tris (hidroximetil) aminoetano

V - voltagem

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Relação de algumas fosfolipases A₂ Asp-49 e Lys-49 de peçonhas do gênero *Bothrops*. (pag 13).

Tabela II: Rendimento protéico e de atividade PLA₂ das frações obtidas no fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* em CM-Sepharose, Phenyl-Sepharose CL-4B e HPLC. (pag 49).

Tabela III: Alinhamento da sequência N-terminal dos primeiros 15 resíduos da BP-PLA₂ com outras sequências de PLA₂s ácidas e básicas isoladas de peçonhas ofídicas. (pag 61).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Perfil cromatográfico do fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*. (pag 44).

Figura 2: Cromatografia em Phenyl-Sepharose CL-4B da fração CM1 da peçonha de *Bothrops pauloensis*. (pag 45).

Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com condições desnaturantes. (pag 46).

Figura 4: Perfil da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. (pag 47).

Figura 5: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes. (pag 50).

Figura 6: Curva padrão para a determinação do ponto isoeletrico da BP-PLA₂. (pag 51).

Figura 7: Perfil comparativo da atividade fosfolipásica da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* e frações. (pag 53).

Figura 8: Atividade hemolítica da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* ou BP-PLA₂. (pag 54).

Figura 9: Atividade de agregação plaquetária da BP-PLA₂ da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*. (pag 55).

Figura 10: Indução de edema tempo-dependente. (pag 56).

Figura 11: Níveis plasmáticos de creatina cinase (CK) obtido do plasma de camundongos injetados com peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* ou BP-PLA₂. (pag 57).

Figura 12: Fotomicrografia de cortes finos transversais com 6,0 µm de espessura do músculo gastrocnemius direito de camundongos, após 24 horas de inoculação. (pag 60).

1-INTRODUÇÃO GERAL

Segundo dados epidemiológicos dos acidentes ofídicos no Brasil, o envenenamento por serpentes é mais comum em pessoas do sexo masculino e em trabalhadores rurais, atingindo principalmente membros inferiores. A maioria destes acidentes é atribuída a serpentes do gênero *Bothrops* (Bochner, Struchiner, 2003).

O gênero *Bothrops*, pertence à família Viperidae, possui algumas das espécies mais importantes do ponto de vista médico, já que por ano são relatados de acordo com dados do Ministério da Saúde, cerca de 18.000 acidentes botrópicos, os que equivalem a 90% dos acidentes ofídicos que o Brasil registra. A letalidade aproxima-se de 0,3% nos casos tratados (Cardoso *et al.*, 2003). Este gênero é formado por serpentes de médio o grande porte e são conhecidas por serem muito ágeis e agressivas (Castro *et al.*, 2001).

Estas serpentes são popularmente conhecidas por jararaca ou jararaca-do-rabo-branco. Estas habitam preferencialmente zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores. Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares. Podem apresentar comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, desferindo botes sem produzir ruído (Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, 1998).

Bothrops pauloensis foi descrita como *Bothrops neuwiedi pauloensis*, constituindo uma das doze subespécie de *Bothrops neuwiedi*. Recentemente, com a revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* realizado por Silva (2000) as doze subespécies passaram a ser consideradas sete espécies distintas, proposta aceita pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH, 2005).

Bothrops pauloensis está listada apenas no Brasil, tendo sido registrada em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo (Silva, 2000).

Ocorre no cerrado da zona geográfica do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, inclusive em áreas alteradas (Brites *et al.*, 1988).

A peçonha botrópica é extremamente complexa compreendendo uma variedade de substâncias farmacologicamente ativas que atuam sinergicamente 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 e em menor proporção aminoácidos livres e lipídeos (Souza *et al.*, 2001).

As peçonhas ofídicas constituem importantes objetos de estudo e são extensivamente estudadas com o intuito de se compreender aspectos estruturais e mecanismos de ação das toxinas isoladas. As peçonhas do gênero *Bothrops* são formadas por uma variedade de toxinas as quais incluem metaloproteases, serinoproteases, desintegrinas, miotoxinas, fosfolipases A₂, L-amino oxidases, fosfomonoesterases, fosfodiesterases, acetilcolinesterase, arginina esterase, hialuronidase, 5'-nucleotidase e NAD-nucleosidase (Russel., 1980; Tu., 1988; Meier., 1990; Stocker., 1990).

As fosfolipases A₂ (PLA₂s E.C. 3.1.1.4) são enzimas de grande interesse médico-científico devido ao seu envolvimento em grande variedade de doenças inflamatórias humanas e nos envenenamentos ofídicos e de abelhas. Possuem importantes papéis no catabolismo de lipídeos da dieta e no metabolismo geral de lipídeos estruturais de membranas celulares. Com a ação da enzima, os fosfolipídeos são hidrolisados, desestruturando a membrana e comprometendo a sua permeabilidade seletiva. A hidrólise ocorre especificamente na ligação 2-acil éster de 3-sn-fosfolipídeos, liberando ácidos graxos livres e lisofosfatídeos (Arni e Ward, 1996; Kini *et al.*, 2003). Os ácidos graxos liberados, como ácido araquidônico e ácido oléico podem ser importantes na estocagem de

energia. O ácido araquidônico pode também funcionar como segundo mensageiro e como precursor de eicosanóides, que são potentes mediadores da inflamação e transdução de sinais (Dennis, 1997). Estas enzimas, amplamente distribuídas na natureza, são encontradas tanto no interior como no exterior da célula (Dennis, 1994). As PLA₂ intracelulares estão frequentemente associadas a membranas e envolvidas com o metabolismo de fosfolípidos e outras funções celulares (Mukheerjee *et al.*, 1994). As extracelulares são amplamente distribuídas em secreções pancreáticas, exudados inflamatórios e nas peçonhas de serpentes e artrópodes.

De acordo com Six e Dennis, 2000, as fosfolipases A₂ extracelulares foram divididas em doze classes I a XII, com base no número de resíduos de aminoácidos e posição das ligações dissulfeto. As fosfolipases A₂ de serpentes estão todas reunidas nos grupos I e II, estas são proteínas de 119 a 143 resíduos de aminoácidos com peso molecular variando entre 13.000 e 18.000. As enzimas da classe I são encontradas em peçonhas de serpentes do gênero *Elapidae* e *Hydrophidae*; enquanto as da classe II são encontradas principalmente em peçonha de serpentes crotálicas e viperídeas (Ward *et al.*, 2001). As enzimas da classe III apresentam um menor grau de similaridade sequencial em relação às classes I e II das PLA₂s. Contudo, dois motivos comuns são evidentes: a região do sítio ativo (-CCxxHDxC-), 32-39 na classe III e 44-51 nas classes I e II e o “loop” ligante de cálcio (-W/YCGxG-), 10-14 na classe III e 28-32 nas classes I e II (Scott *et al.*, 1990).

As PLA₂s representam uma classe de enzimas versáteis, considerando sua função, localização, regulação, mecanismo de ação, sequência, estrutura e papel dos íons metálicos divalentes. A sequência de aminoácidos de mais de 280 fosfolipases já foram determinadas e algumas de suas estruturas tridimensionais foram resolvidas por cristalografia de raios X e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (Arni e Ward, 1996; Balsinde *et al.*,

1999; Six e Dennis, 2000; Kini, 2003). A análise destas estruturas primárias possibilitou a sugestão e a predição de determinantes estruturais de algumas atividades farmacológicas (Kini e Iwanaga, 1986; Ward *et al.*, 1988; Kini e Evans, 1989). E agora, associada com resolução de estruturas tridimensionais, ampliou-se ainda mais o conhecimento das bases moleculares do mecanismo de ação destas toxinas.

A molécula de PLA₂ é estabilizada por sete ligações dissulfeto nas posições 11-77, 27-124, 29-45, 44-105, 51-96, 61-91 e 84-98 (Harris, 1991). A divisão entre as classes I e II é baseada em dois critérios estruturais que são identificados na sequência de aminoácidos: (a) nas enzimas da classe II falta a ligação Cys 11- Cys 77, mas aparece outra ponte dissulfeto alternativa, Cys 51-Cys 133 e (b) a classe I possui cerca de dois a três aminoácidos inseridos na região 52-65, chamada de “loop elapídico”, enquanto que a classe II possui esta volta truncada, mas, em adição apresenta de cinco a sete aminoácidos extendendo a região C-terminal (Arni e Ward, 1996).

As PLA₂s que possuem o resíduo aspartato na posição 49 são enzimaticamente ativas, requerem cálcio para estabilização de uma conformação catalítica, possuindo sítio de ligação de cálcio (Verheij *et al.*, 1980) que é formado pelo grupo β-carboxílico do Asp-49 e os grupos C=O carbonílicos da Tyr28, Gly30 e Gly32 (Fleeer *et al.*, 1981). Duas moléculas de água estruturalmente conservadas completam a esfera de coordenação do Ca⁺⁺ formando uma bipirâmide pentagonal (Scott *et al.*, 1990). A substituição por outros íons divalentes como bário ou cádmio, inibidores competitivos, resulta em uma significativa redução da atividade (Yu *et al.*, 1993).

A atividade catalítica destas enzimas sobre membranas celulares de tecidos específicos sugere um importante papel destas na toxicidade dos venenos. Independentemente da sua função catalítica primária, as fosfolipases A₂ de venenos de

serpentes podem induzir diversos efeitos farmacológicos adicionais como neurotoxicidade pré e/ou pós-sináptica, cardiotoxicidade, miotoxicidade, iniciação e/ou inibição da agregação plaquetária, edema, hemólise, anticoagulação, convulsão, hipotensão, efeito bactericida e anti-HIV (Bon *et al.*, 1979; Fletcher *et al.*, 1980; 1981; Huang, 1984; Alvarado e Gutierrez, 1988; Lloret e Moreno 1993; Yuan *et al.*, 1993; Fuly *et al.*, 1997; Páramo *et al.*, 1998; Ownby, 1998; Soares *et al.*, 1998; Fenard *et al.*, 1999).

Nas últimas décadas, houve um crescente interesse no estudo dos componentes do veneno responsáveis pela mionecrose e seu modo de ação, resultando no isolamento e na caracterização de diversas fosfolipases A₂ que causam miotoxicidade. A grande maioria das PLA₂s miotóxicas isoladas de venenos de serpentes botrópicas, descritas até agora, são proteínas de caráter básico, ponto isoelétrico variando entre 7.0 e 10.0, que possuem atividade catalítica ou “não”, sobre substratos artificiais. As análises da composição em aminoácidos indicaram que essas miotoxinas são ricas em aminoácidos básicos e hidrofóbicos (Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988; Selistre *et al.*, 1990; Lomonte *et al.*, 1990; Díaz *et al.*, 1995; Mancuso *et al.*, 1995; Angulo *et al.*, 1997). Apresentam também um alto número de resíduos de meia-cistina, o que sugere a presença de várias pontes dissulfeto intracadeia. As PLA₂s tóxicas são muito estáveis, provavelmente como resultado da extensa ligação cruzada, tornando-as ativas em uma ampla faixa de pH e temperatura.

As miotoxinas isoladas dos venenos botrópicos pertencem ao grupo II das fosfolipases e podem ser subdivididas em dois subgrupos: (i) Asp-49 que são as miotoxinas com atividade enzimática alta, cataliticamente ativas e (ii) Lys-49 que são as miotoxinas que praticamente possui baixa ou nenhuma atividade enzimática sobre substratos artificiais (Ownby *et al.*, 1999). A diferença nas propriedades enzimáticas das duas classes de proteínas está baseada principalmente na presença do resíduo de aspartato (Asp) na posição

49 no primeiro grupo, quando comparado com a presença de lisina (Lys) na mesma posição da cadeia polipeptídica no outro grupo. A troca de aminoácidos é suficiente para causar a perda da habilidade da proteína em se ligar no cálcio (Ca^{2+}), um cofator essencial para fazer com que a enzima expresse sua atividade catalítica.

A necrose muscular ou mionecrose pode ser devida à ação direta de fosfolipases A_2 miotóxicas sobre as membranas plasmáticas de células musculares, ou indireta, como consequência de degenerações vasculares e isquemia, causadas por hemorraginas presentes nos venenos de serpentes. As miotoxinas agiriam ao nível da membrana sarcoplasmática, induzindo uma desorganização dos componentes fosfolipídicos que permitiriam a saída de moléculas intracelulares como creatina e creatina-cinase (Gutiérrez *et al.*, 1986; 1989). Os efeitos característicos das fosfolipases miotóxicas, segundo Harris (1991) são: (a) 0-1 h: edema confinado ao espaço extravascular; (b) 1-3 h: degeneração e hipercontração das miofibrilas e acúmulo de fagócitos na luz dos vasos sanguíneos e no espaço perivascular; (c) 3-6 h: invasão das fibras musculares necrosadas pelas células fagocíticas, colapso do potencial das fibras musculares e rompimento da membrana sarcoplasmática; (d) 6-24 h: degeneração total das fibras musculares individuais. Estas enzimas podem destruir os terminais nervo-motores dos músculos, mas não interferem com as arteríolas, capilares, vênulas ou nervos intramusculares.

Vários trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de elucidar o mecanismo molecular pelo qual as PLA_2 s induzem mionecrose. Gutiérrez e Lomonte em 1995 propuseram um modelo hipotético para o entendimento do mecanismo de ação das miotoxinas Lys-49: 1- ligação da miotoxina em um sítio não identificado localizado na membrana sarcoplasmática; 2- interação eletrostática entre o sítio catiônico da toxina com grupos carregados negativamente na membrana; 3- penetração da miotoxina na bicamada

por uma interação hidrofóbica mediada pela região citotóxica da molécula; 4- penetração da região citotóxica no centro da bicamada (o efeito seria a desorganização e ruptura da membrana, com conseqüente prejuízo na regulação da permeabilidade seletiva); 5- grande influxo de íons cálcio e início de uma variedade de mecanismos degenerativos.

Atualmente muitos autores buscam esclarecer uma via intracelular e um possível sítio de ligação na membrana plasmática que poderia ser alvo dessas PLA₂s. Dessa forma vários estudos visam identificar na estrutura das PLA₂s resíduos de aminoácidos específicos que estariam envolvidos no reconhecimento celular, permitindo uma ação catalítica local da enzima a fim de iniciar o processo de transdução de sinais, o qual levaria a formação de mensageiros celulares que modulariam a ação dessas enzimas ao nível celular. Kini (2003) fez uma interessante revisão da relação estrutura–função dessas enzimas. Ele propõe que as diferentes ações farmacológicas induzidas pelas PLA₂s se devem a capacidade que estas enzimas possuem de se ligar com alta afinidade a aceptores celulares, por meio de interações iônicas, hidrofóbicas e de van der Waals. Uma vez ligada ao seu alvo essas enzimas podem induzir seus efeitos farmacológicos por mecanismos dependentes ou independentes de sua atividade catalítica. Devido ao largo espectro de alvos específicos em vários tecidos e órgãos, a identificação destes sítios farmacológicos presentes na estrutura dessas enzimas se torna um campo vasto de investigações para as áreas da saúde e biotecnologia.

Alguns procedimentos são utilizados rotineiramente a fim de se compreender o complexo mecanismo de ação dessas enzimas tão versáteis, tais como: modificações químicas em resíduos de aminoácidos específicos (Soares e Giglio, 2003), mutagênese sítio dirigida (Chioato e Ward, 2003), análises cristalográficas (Wang *et al.*, 1996) e a utilização

de substratos naturais e artificiais (Ownby *et al.*, 1999). Estes estudos revelaram a importância do resíduo aspartato na posição 49 para a ligação do Ca^{2++} , pois a substituição Asp49 para Glu-49 leva a redução de 12 vezes na afinidade pelo cálcio isso leva a perda da atividade catalítica. Outras substituições por Asn, Gln, Lys ou Ala, nesta posição, através de mutagênese sítio dirigida, demonstraram que todas as linhagens mutantes perdiam a afinidade pelo cálcio ligante, mas a estabilidade conformacional das proteínas mutantes era a mesma à proteína nativa. Sendo assim, o resíduo de Asp-49 tem importância funcional no mecanismo de catálise da PLA_2 , provavelmente pela capacidade de ligação e orientação correta ao íon cálcio, porém, este aminoácido não tem relevância na estabilidade da conformação estrutural desta enzima (Li *et al.*, 1994).

A substituição de outros aminoácidos na região ligante de Ca^{2++} pode causar mudança na atividade, como a substituição por Asn-28, Leu-32 e Asn-33 (ou Arg-33, His-33) que provavelmente favorece a redução da ligação de cálcio e inativa a enzima (Wang *et al.*, 1996). O resíduo de His-48 está envolvido na catálise, a sua alquilação induz uma perda de atividade enzimática e toxicidade (Soares *et al.*, 2000). Fosfolipases A_2 miotóxicas Lys-49 quando modificadas nos resíduos de His sofrem perda da atividade miotóxica e citotóxica, enquanto outras modificações no resíduo de Trp parecem afetar somente a atividade miotóxica. Modificações com Tyr e Trp das fosfolipases A_2 miotóxicas Asp-49 revelaram uma correlação entre os efeitos miotóxicos e citotóxicos e em menor extensão sobre efeitos enzimáticos, indução de edema e rompimento de lipossomos. Em contraste, esses resíduos podem ser menos importantes para as atividades anticoagulantes e pro-inflamatória, suportando assim a hipótese da dissociação entre sítio catalítico e farmacológico (Andrião-Escarso *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2001).

Durante os últimos 20 anos, vários PLA₂s de peçonhas botrópicas foram isoladas e caracterizadas estrutural e funcionalmente. A presença de fosfolipases A₂ básicas foi primeiramente encontrada no veneno de *Bothrops jararacussu* por Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988, que isolaram parcialmente e caracterizaram as toxinas BthTX-I e BthTXII, que pertencem a classe das miotoxinas Lys-49 e Asp-49 respectivamente (Cintra *et al.*, 1993). Várias PLA₂s possuem sua sequência de aminoácidos já determinada, algumas PLA₂s Lys-49 e Asp-49 miotóxicas do gênero *Bothrops* foram descritas (Tabela I).

A purificação e caracterização de fosfolipases A₂ ácidas dos venenos de serpentes vêm crescendo bastante nos últimos tempos. Nisenbon *et al* (1988) purificaram e caracterizaram uma PLA₂ ácida tóxica isolada do veneno de *B. alternatus*. Esta toxina apresentou uma única banda com peso molecular de 15kDa e ponto isoelétrico 5.08 e se mostrou bastante tóxica sobre alguns órgãos como pulmão, fígado, rim e coração. Fuly *et al* (2000) e Fuly *et al* (2002) descreveram que as fosfolipases A₂ ácidas isoladas do veneno de *Lachesis muta* (LM-PLA₂-I e LM-PLA₂-II) também induzem mionecrose em camundongos, diretamente sobre as fibras musculares ou indiretamente pela liberação de creatina-cinase. Do veneno de *Bothrops jararacussu* foram isoladas quatro fosfolipases ácida denominadas de SIIISPIIA, SIIISPIIB, SIIISPIIIA e SIIISPIIIB, estas toxinas apresentaram massa molecular em torno de 15kDa e pontos isoelétricos de 5.3 (Ketelhut *et al.*, 2003). Do veneno de *Bothrops lanceolatus* também foi isolada uma mistura de várias isoformas de PLA₂, com pesos moleculares de 14.5kDa e 15kDa, as quais diferiam levemente no seus pontos isoelétricos (4.9 e 5.3) e na composição de aminoácidos (Araújo *et al.*, 1994).

Daniele *et al.*, 1995 isolaram duas fosfolipases ácidas do veneno de *Bothrops neuwiedi* denominadas de P1 e P2 e posteriormente estas proteínas foram caracterizadas quimicamente possuindo peso molecular 15kDa e 16.2kDa e ponto isoelétrico de 4.8 e 4.6, respectivamente. Estas enzimas não demonstraram efeito letal, miotóxico, hemolítico ou anticoagulante e não foram capazes de inibir a agregação plaquetária. Entretanto ambas isoenzimas exibiram uma importante atividade edematogênica. Posteriormente, outra fosfolipase A₂ ácida do mesmo veneno foi isolada e denominada de P3 de 15kDa, esta também não apresentou efeito letal *in vivo*, mas apresentou efeito citotóxico *in vitro*. O efeito citotóxico de P3 foi completamente dependente de sua atividade enzimática. A resposta inflamatória apresentada pela P3 foi similar à observada pelas outras isoformas ácidas, sugerindo o envolvimento de pequenos mediadores como histamina e mastócitos (Daniele *et al.*, 1995).

Atualmente, o conhecimento da composição protéica das peçonhas de serpentes, tem assumido uma importância significativa, não apenas no aspecto terapêutico específico ligado a acidentes ofídicos, mas também por seu amplo potencial farmacológico, onde toxinas isoladas têm se revelado como valiosos instrumentos de pesquisa nas diversas áreas do conhecimento.

Tabela I: Relação de algumas fosfolipases A₂ Asp-49 e Lys-49 de peçonhas do gênero *Bothrops*.

FOSFOLIPASES A₂	ESPÉCIE	pI	Peso Molecular	Atividade Fosfolipásica	REFERÊNCIA
Basp-II	<i>B.asper</i>	nd	13.300	-	Francis <i>et al</i> ,1991
BthTX-I	<i>B.jararacussu</i>	8.2	13.869	-	Cintra <i>et al.</i> , 1993
PrTX-I	<i>B. pirajai</i>	8.2	13.600	-	Toyama <i>et al.</i> ,1998
PrTX-II	<i>B.pirajaí</i>	8.2	14.800	-	Toyama <i>et al.</i> ,2000
BnSP-6	<i>B. neuwiedi</i>	8.6	13.500	-	Soares <i>et al.</i> ,2000
BnSP-7	<i>B. neuwiedi</i>	8.8	13.500	-	Soares <i>et al.</i> ,2000
MjTX-I	<i>B. moojeni</i>	8.2	13.400	-	Soares <i>et al.</i> ,2000
MjTX-II	<i>B. moojeni</i>	8.2	14.000	-	Soares <i>et al.</i> ,2000
BnpTX-I	<i>B. neuwiedi</i>	7.8	14.000	+	Rodrigues <i>et al.</i> ,2004
BnpTX-II	<i>B. neuwiedi</i>	7.8	14.000	+	Rodrigues <i>et al.</i> ,2004
BthTX-II	<i>B.jararacussu</i>	7.7	15.700	+	Cintra <i>et al.</i> , 1993
SIISPIIA	<i>B.jararacussu</i>	5.3	15.000	+	Ketelhut <i>et al.</i> ,2003

nd-não determinado; (-)ausência de atividade; (+) presença de atividade.

2-OBJETIVOS

2.1-OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar química, biológica e enzimaticamente uma fosfolipase A₂ ácida da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*.

Avaliar o dano do tecido muscular induzido pela PLA₂ ácida e pela peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* no músculo gastrocnêmio através de estudos de microscopia de luz.

3-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarado, J., Gutiérrez, J. M., Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae), Rev. Biol. Trop 36 (1988) 563-565.

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 82 (2000) 755-763.

Angulo, Y., Chave, E., Alape, A., Rucavado, A., Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., Isolation and characterization of a myotoxic phospholipase A₂ from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) scheledelii* from Costa Rica, Arch Biochem Biophys 339 (1997) 260-266.

Araújo, A. L., Radvany, F., Bon, C., Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom, Molecular and Enzymatic properties, Toxicon 32 (1994) 1069-1081.

Arni, R. K., Ward, R. J., Phospholipase A₂ – A structural review, Toxicon 34 (1996) 827-841

Balsinde, J., Balboa, M. A., Insel, P. A., Dennis, E. A., Regulation and inhibition of phospholipase A₂, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol 39 (1999) 175-189

Bochener, R., Struchiner, C. I., Snakebite epidemiology in the last 100 years in Brazil, A Review Cad Saude Pública, 19 (2003) 7-16.

Bon, C., Changeaux, J. P., Jeng, T. W., Post-synaptic effects of crotoxin and its isolated subunits, Eur. J. Biochem. 99 (1979) 471-481.

Brites, V. L. C., Bauab, F. A., Fauna ofidiana do município de Uberlândia, Minas Gerais - Brasil, Ocorrência na área urbana. R. Cent. Ci. Biomed. Universidade Federal de Uberlândia 4 (1988) 3-7.

Cardoso, J. L. C., Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003.

Castro, H. C., Silva, D. M., Craik, C., Zingali, R. B., Structural features of snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? Biochimica et Biophysica Acta 1547 (2001) 183-195

Chioato, L., Ward, R. J., Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipase A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis, Toxicon 42 (2003) 869-883

Cintra, A. C. O., Marangoni, S., Oliveira, B., Giglio, J. R., Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function, J. Prot. Chem 12 (1993) 57-64

Danielle, J. J., Bianco, I. D., Fidelo, G. D., Kinetic and pharmacological characterization of phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi* venom, Arch. Bioch. Bioph. 318 (1995)65-70

Dennis, E. A., Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A₂, Minireview J. Biol. Chem 269 (1994) 13057-13060

Dennis, E. A., History, classification, structure and function of phospholipase A₂, Phospholipase A₂: Basic and clinical aspects in inflammatory diseases (1997) 1-10

Díaz, C., Lomonte, B., Zamudio, F., Gutiérrez, J. M., Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A₂ variant from *Bothrops asper* snake venom, Natural Toxins 3 (1995) 26-31

Fernard, D., Lambeau, G., Valentin, E., Lefebvre, J. C., Lazdunski, M., Doglio, A ., Secreted phospholipase A₂ a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells, J. Clin. Invest 104 (1999) 611-618

Fleer, E. A., M., Verheij, H. M., de Haas, G. H., Modification oc carboxilate groups in bovine pancreatic phospholipase A₂, Europ. J. Biochem 113 (1981) 283-288

Fletcher, J. E., Rapuano, B. E., Condrea, E., Yang, C. C., Rosenberg, P., Relationship between catalysis and toxicological properties of three phospholipases A₂ from elapid snake venoms, Toxic Appl. Pharmac 59 (1981) 375-382

Fletcher, J. E., Rapuano, B. E., Condrea, E., Yang, C. C., Ryan, M., Rosenberg, P., Comparison of relatively toxic phospholipase A₂ from *Naja nigricolis* snake venom with that of a relatively non-toxic phospholipase A₂ from *Hemachatus hemachatus* snake venom II, *Biochem. Pharmac.* 29 (1980) 1565-1575

Francis, B., Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., Kaiser, I. I., Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine 49 phospholipase A₂, *Arch. Biochem. Biophys* 284 (1991) 352-359

Fuly, A.L., Machado, O. L., 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* 78 (1997) 1372-1380

Fuly, A .L., Calil-Elias, S., Zingali, R. B., Guimarães, J. A., Melo, P. A., Myotoxic activity of na acidic phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom, *Toxicon* 38 (2000) 961-972

Fuly, A. L., de Miranda, A. L. P., Zingali, R. B., Guimarães, J. A., Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom, *Biochem. Pharmacol.* 63 (2002) 1589-1597

Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., Chaves, F., Moreno, E., Cerdas, S. L., Pharmacological activities of a toxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*, *Comp. Biochem. Physiol.* 84C (1986) 159-164

Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., Cerdas, S. L., Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*, *Toxicon* 24 (1986) 885-894

Gutiérrez, J. M., Chaves, F., Gené, J. A., Lomonte, B., Camacho, Z., Schosinsky, K., Myonecrosis induced by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (Jumping viper) from Costa Rica, *Toxicon* 27 (1989) 735-746

Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms, *Toxicon* 33 (1995) 1405-1424

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

Homsí-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* 26 (1988) 615-627

Huang, H. C., Release of slow reacting substance from the guinea-pig lung by phospholipase A₂ of *Vipera russelli* snake venom, *Toxicon* 22 (1984) 359-365

Ketelhut, D. F. J., Homem de Melo, 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* 85 (2003) 983-991

Kini, R. M., Iwanaga, S., Structure-function relationships of phospholipases I: prediction of presynaptic neurotoxicity, *Toxicon* 24 (1986) 527-541

Kini, R., Evans, H. J., A common cytolytic region in myotoxins, hemolysis, cardiotoxins and antibacterial peptides, *Int. J. Peptide Prot. Res.* 34 (1989) 286-277

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

Li, Y., Yu, B. Z., Zhu, H., Jain, M. K., Tsai, M. O., Phospholipase A₂ engineering, *Biochem* 33 (1994) 14714-14722

Lloret, S., Moreno, J. J., Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms, *Toxicon* 31 (1993) 949-956

Lomonte B., Gutiérrez J. M., Furtado M. F., Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms, *Toxicon* 28 (1990) 1137-1146

Mancuso, L. C., Correa, M. M., Vieira, C. A ., Cunha, O . A. B., Lachat, J. J., Selistre-de-Araujo, H. S., Ownby, C. L., Giglio, J. R., Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein, *Toxicon* 33 (1995) 615-626

Meier, J., Venomous snake, In: Medical Use of Snake Venom Proteins, Stocker, K. P. (Ed.), (1990) 1-32

Mukherjee, A . B., Miele, L., Pattabiraman, N., Phospholipase A₂ enzymes regulation and physiological role, Biochem. Pharmacol. 48 (1994) 1-10

Nisenbon, H. E., Perazzo, J. C., Monserrat, A . J., Vidal, J. C., Effect of chemical modification with p-BPB on the lethal properties os phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (Vibora de La Cruz) venom, Toxicon 26 (1988) 1137-1144

Ownby, C. L., Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms, J. Toxicol.-Toxin Reviews 17 (1998) 213-238

Ownby, C. L., Selistre-de-Araújo, H. S., White, S. P., Fletcher, J. E., Lysine 49 phospholipase A₂ proteins, Toxicon 37 (1999) 411-445

Páramo, L., Lomonte, B., Pizarro-Cerdá, J., Bengoecha, J. A ., Gorvel, J. P., Moreno, E., Bactericidal activity of Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom, Eur. J. Biochem 235 (1998) 452-461

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

Russel, F. E., Venoms. In: Snake Venom Poisoning, (1980) 139-234. Lippincott, Philadelphia

SBH. Lista de espécies de répteis do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Disponível em : www.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm (2005)

Scott, D. L., White, S. P., Owinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M. H., Sigler, P. B., Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂, Science 250 (1990) 1541-1546

Selistre, H. S., Queiroz, L. S., Cunha, O . A .B., de Souza, G. E. P., Giglio, J. R., Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (Jararaca ilhoa) snake venom, Toxicon 28 (1990) 261-273

Silva, V. X., Revisão sistemática do complexo (Serepntes, Viperidae, Crotalinae). Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo, (2000) 134p

Six, D. A., Dennis, E. A., The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization, Biochim. Biophys. Acta 1488 (2000) 1-19

Soares, A M., Rodrigues, V. M., Homsí-Brandeburgo, M. I., Toyama, M. H., Lombardi, F. R., Arni, R. K., Giglio, J. R., A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical, characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity, Toxicon 36 (1998) 503-514

Soares A M., Guerra-Sá R., Borja-Oliveira C. R., Rodrigues V. M., Rodrigues-Simionini L., Fontes M. R. M., Lomonte B., Gutiérrez J. M., Giglio J. R., Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys-49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom, Arch. Biochem. Biophys. 378 (2000) 201-209

Soares, A. M., Mancin, A. C., Cecchini, A. L., Arantes, E. C., França, S. C., Gutierrez, J. M., Giglio, J. R., Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A(2) subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities, Int J Biochem Cell Biol 33 (2001) 877-88

Soares, A. M., Giglio, J. R., Chemical modifications of Phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties, Toxicon 42 (2003) 855-868

Souza, J. R. F., Monteiro, R. Q., Castro, H. C., Zingali, R. B., Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents, Toxicon 39 (2001) 787-792.

Stocker, K., Composition of snake venoms, In: Medical Use of snake venom proteins, (1990) 35-56

Toyama, M. H., Soares, A. M., Vieira, C. A., Novello, J. C., Oliveira, B., Giglio, J. R., Marangoni, S., Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide, J. Protein Chem. 17 (1998) 713-718

Toyama, M. H., Soares, A., M., Novello, J. C., Oliveira, B., Giglio, J. R., Marangoni, S., Amino acid sequence of piratoxin-II, a Lys-49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom, *Biochimie* 82 (2000) 245-250

Tu, A., T., Snake venoms: General background and composition. In: *Venoms Chemistry and Molecular Biology* (1988) 1-19, John Wiley and Sons, New York

Verheij, H. M., Volwerk, J. J., Jansen, E. H. J. M., Puyg, W. C., Dijkstra, B. W., Drenth, J., de Haas, G. H., Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂ role of histidine and calcium ion in catalytic mechanism, *Biochem* 19 (1980) 743-750

Wang, Y. M., Wang, J. M., Pan, F. M., Tsai, I. M., Lys-49 phospholipase A₂ homologs from venoms of *Deinagkistrodon acutus* and *Trimeresurus mucrosquamatus* have identical protein sequence, *Toxicon* 34 (1996) 485-489

Ward, R. J., Rodrigues Alves, A., Ruggiero Neto, J., Arni, R. K., Casari, G., A sequencespace analysis of phospholipase A₂, *Prot. Eng.* 11 (1988) 285-294.

Ward, R. J., Oliveira, A.H., Bortoleto, R. K., Rosa, J. C., Faca, V. M., Greene, L. J., Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys-49 phospholipase A₂ homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*, *Prto. Expr. Purif* 21 (2001) 134-140

Yu, B. Z., Berg, O . G., Jain, M. K., The divalent cation is obligatory for the binding of ligands to the catalytic site of secreted PLA₂, *Biochem* 32 (1993) 6484-6492

Yuan, Y., Jackson, S. P., Mitchell, C. A ., Salem, H. H., Purification and characterization of a snake venom phospholipase A₂: a potent inhibitor of aggregation platelet, *Thromb. Res.* 70 (1993) 471-481

4- CAPÍTULO ÚNICO

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA FOSFOLIPASE A₂ ÁCIDA DA PEÇONHA DE *Bothrops pauloensis*

RESUMO

As fosfolipases A₂ (PLA₂) são pequenas enzimas que apresentam massa molecular em torno de 15kDa e são encontradas em uma variedade de fluídos biológicos e celulares, como fluido sinovial, macrófagos, plaquetas, secreção pancreática, dentre outros. O presente trabalho descreve a purificação e caracterizações químicas, biológicas e enzimáticas de uma fosfolipase A₂ ácida da peçonha de *Bothrops pauloensis*. A nova fosfolipase A₂ foi denominada BP-PLA₂, esta enzima foi purificada por cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose Fast Flow seguido por cromatografia hidrofóbica em Phenyl Sepharose CL-4B e finalizando em cromatografia de fase reversa RP-HPLC em coluna C8. BP-PLA₂ consiste em uma proteína de 15.8kDa e ponto isoelétrico de 4.34. A sequência N-terminal da enzima revelou uma significativa homologia com as Asp-49 ácidas de outras peçonhas de serpentes nos primeiros quinze aminoácidos. A atividade catalítica da BP-PLA₂ foi de 315 U/mg, mostrando um aumento considerável da atividade PLA₂ e foi capaz de induzir alta atividade hemolítica indireta nos diferentes intervalos de tempo. A fosfolipase A₂ ácida foi capaz de inibir a agregação plaquetária na presença de colágeno, fato não ocorrido quando esta foi incubada com ADP. Apresentou uma atividade edematogênica bastante pronunciada em pata de camundongos. BP-PLA₂ induziu efeitos miotóxicos, sendo a caracterização realizada por dosagem de creatina cinase (CK) e análises morfológicas. Estes estudos indicaram um aumento dos níveis de creatina quinase plasmáticos no tempo de 1 hora e as análises histológicas indicaram que a PLA₂ induziu um intenso edema, com evidente infiltrado leucocitário e dano nas células musculares após 24 horas de injeção da toxina.

Palavras chaves: *Bothrops pauloensis*, peçonha, fosfolipase A₂ ácida, miotoxicidade.

ABSTRACT

Phospholipases A₂ (PLA₂) is small enzymes that present molecular mass around 15kDa and are found in a variety of biological and cellular fluids as fluid sinovial, macrophages, platelet, pancreatic tissue, among others. The present work describes the purification and chemical, biological and enzymatic characterization of an acidic phospholipase A₂ of *Bothrops pauloensis* snake venom. New fosfolipase A₂ was called BP-PLA₂, this enzyme was purified by ionic exchange in CM-Sepharose Fast Flow followed for hidrophobic chromatography in Phenyl Sepharose CL-4B and finishing in C8 reverse-phase column. BP-PLA₂ consists of a protein of 15.8kDa and isoelectric point of 4.34. The N-terminal sequences of the enzyme displayed a significant homology with the Asp-49 acid of other snake venoms in first fifteen amino acids. The catalytic activity of the BP-PLA₂ was 315 U/mg, showing a considerable increase of activity PLA₂ and was capable to induce high indirect hemolytic activity in the different intervals of time. Acidic phospholipase A₂ was capable to inhibit platelet aggregation at the presence of collagen, fact not occurred when this enzyme was incubated with ADP, showed a sufficiently sharp edematogenic activity in paw mice. BP-PLA₂ induced miotoxic effect, being the characterization carried through for creatine kinase (CK) levels and morphological analyses. These studies had indicated an increase of the creatine kinase levels in 1 hour and the histological analyses had indicated that the PLA₂ induced an intense edema with evident leucocitary infiltration and damage in the muscular cells after 24 hours of injection of the toxin.

Keywords: *Bothrops pauloensis*, snake venom, acidic phospholipase A₂, miotoxicity.

5-INTRODUÇÃO

Envenenamentos causados por serpentes botrópicas são caracterizados por um evidente dano tecidual que envolve dor, hemorragia, edema, mionecrose e inflamação no local da picada. Estes efeitos são manifestados logo após o acidente e resultam da ação sinérgica de fosfolipase A₂, miotoxinas e metaloproteases, encontradas na peçonha destas serpentes (Gutierrez e Lomonte, 1989; Kamiguti *et al.*, 1996).

Os venenos de serpentes são misturas complexas de proteínas e peptídeos com diversas atividades farmacológicas. Enquanto o efeito neurotóxico é mais pronunciado em envenenamento por serpentes da família Elapidae, envenenamento por serpentes da família Viperidae são usualmente caracterizados por hemorragia local e sistêmica (Tan e Ponnudurai, 1990; Mebs e Langeluddeke, 1992). Os venenos de serpentes são ricos em enzimas proteolíticas que atuam numa grande variedade de substratos naturais: caseína, hemoglobina, colágeno, elastina, fibrinogênio, insulina, glucagon, etc (Iwanaga e Suzuki, 1979). Algumas dessas enzimas são toxinas hemorrágicas que degradam a matriz extracelular (Matrisian, 1992), outras afetam a coagulação sanguínea, agindo como procoagulantes, convertendo o fibrinogênio em fibrina (Markland e Damus, 1971; Stocker e Barlow, 1976; Selistre e Giglio, 1987), enquanto outras agem como anticoagulantes por exercerem atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica (Komori *et al.*, 1985; Daoud *et al.*, 1986).

As fosfolipases A₂ são pequenas proteínas que são distribuídas amplamente na natureza, são encontradas em vários sistemas biológicos incluindo as peçonhas de serpentes (Mebs, 1983; Vishwanath *et al.*, 1987). Estas enzimas podem induzir alguns efeitos como neurotoxicidade, miotoxicidade, resposta edematogênica, cardiotoxicidade, indução e/ou

inibição da agregação plaquetária, hemólise, anticoagulação, convulsão e hipotensão (Kini e Evans, 1989).

Elas agem sobre as plaquetas na agregação, secreção e coagulação sanguínea (Mebs, 1983; Vishwanath *et al.*, 1987) e também são capazes de hidrolisar fosfolipídeos produzindo uma variedade de ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos. Alguns ácidos graxos livres podem agir como segundo mensageiros, ou podem estar envolvidos em outras reações como precursores biologicamente ativos como os eicosanóides (Tetsutaro *et al.*, 1991).

A atividade fosfolipásica do veneno está relacionada com uma série de desordens bioquímicas, farmacológicas e patológicas que o envenenamento pode desencadear. Estas enzimas são proteínas compactas de aproximadamente 13 a 18kDa e estão presentes em grande concentração em glândulas como o pâncreas e veneno de serpentes, abelhas e escorpiões.

As fosfolipases A₂ são distribuídas principalmente nas peçonhas de serpentes e de acordo com sua estrutura primária, elas podem ser divididas em dois grupos distintos: (a) Asp-49, que são enzimaticamente ativas catalizando hidrólise de fosfolipídeos e (b) Lys-49, que são desprovidas ou apresentam baixa atividade enzimática (Ownby *et al.*, 1999). A diferença nas propriedades enzimáticas das duas classes de proteínas está baseada principalmente na presença do resíduo de aspartato (Asp) na posição 49 no primeiro grupo, quando comparado com a presença de lisina (Lys) na mesma posição da cadeia polipeptídica no outro grupo. A troca de aminoácidos é suficiente para causar a perda da habilidade da proteína em se ligar no cálcio (Ca²⁺), um cofator essencial para fazer com que a enzima expresse sua atividade catalítica.

No geral, as fosfolipases A₂ miotóxicas são proteínas básicas (Moura-da-Silva *et al.*, 1991; Gutierrez e Lomonte, 1997) e em alguns casos as fosfolipases Lys-49 são mais miotóxicas que as Asp-49 do mesmo veneno (Selistre de Araújo *et al.*, 1996; Ownby *et al.*, 1999).

Durante os últimos anos foi crescente o interesse no estudo dos componentes responsáveis pela mionecrose e seus mecanismos de ação. Como resultado, várias miotoxinas de venenos botrópicos foram isoladas e caracterizadas e alguns processos tem sido feitos para compreender seu mecanismo de ação e a patogênese da mionecrose.

6-MATERIAIS E MÉTODOS

6.1) Obtenção da peçonha de *Bothrops pauloensis* e dos animais.

A peçonha de *Bothrops pauloensis* foi cedida pela Prof^a Vera Lúcia de Campos Brites, do Setor de Répteis da Universidade Federal de Uberlândia e pela Pentapharm do Brasil, sendo posteriormente liofilizados e armazenados a -20°C.

Os animais Swiss foram gentilmente cedidos pelo Instituto Vallé e pela Pentapharm do Brasil.

6.2) Fracionamento da Peçonha Bruta de *Bothrops pauloensis* e obtenção da fosfolipase A₂.

a) Cromatografia da peçonha bruta em troca iônica em CM-Sepharose Fast Flow.

A purificação da fosfolipase A₂ foi realizada com aproximadamente 300mg da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* os quais foram ressuspensos em 2,0ml de tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7.8. Em seguida a mistura foi centrifugada a 10.000 g por 10 minutos 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 a temperatura ambiente pelo estabelecimento de um gradiente convexo de concentração usando o tampão bicarbonato de amônio nas concentrações de 0,05 a 1,0 M. Foram coletadas frações de 3ml/tubo num fluxo de 20ml/hora, em um coletor de frações Redifrac (Amersham Biotec). A absorbância de cada fração coletada foi lida a 280nm num

espectrofotômetro ULTROSPECH 1000. Após traçar o cromatograma os “pools” foram delimitados e as frações liofilizadas (LABCONCO LYPH-LOCK 1L) e armazenadas a -20°C.

b) Cromatografia da fração CM1 em Phenyl-Sepharose CL-4B.

Inicialmente a fração CM1 foi submetida a um sistema de ultrafiltração (AMICON YM 30 e posteriormente YM 10) lavando-se várias vezes com água. A amostra concentrada foi liofilizada e armazenada a 4°C. Cerca de 80 mg desta amostra foram ressuspensa em 2,0 ml de tampão Tris-HCl 10mM pH 8.5 + NaCl 4M. A eluição foi realizada a temperatura ambiente tendo início com o tampão de equilíbrio (Tris-HCl 10mM pH 8.5 + NaCl 4M). A coluna foi lavada com 10 ml do tampão inicial e posteriormente foi eluída utilizando soluções decrescentes em concentração molar de NaCl (3M, 2M, 1M, 0,5M), Tris-HCl 10mM pH 8.5 e finalizando o processo de eluição com água. Foram coletadas frações de 2,5ml/tubo num fluxo de 20ml/hora. A eluição de cada fração foi monitorada a 280nm num espectrofotômetro da SPEKOL, o gráfico traçado e os pools delimitados. Essas frações foram reunidas, liofilizadas e armazenadas para ensaios posteriores.

c) Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC-RP).

Nove mg da fração P5 foram recromatografados em um sistema de RP-HPLC em uma coluna Shimadzu ODS C-8 (octacil sulfonila) (2.0 x 25 cm). A eluição da amostra foi feita com gradiente de concentração linear de acetonitrila 5-60% (v/v) em ácido

trifluoracético 0,1% (v/v) a um fluxo de 1.0 ml/min. Todos os passos de purificação foram realizados em temperatura ambiente. O pico ativo foi coletado e liofilizado.

6.3) Determinação quantitativa de proteínas

As dosagens de proteínas em soluções contendo 0,1 a 2,0mg/2,0ml foram realizadas pelo método do microbiureto, conforme descrito por Itzhaki e Gill, 1964. A reta padrão foi construída com soroalbumina bovina, considerando-se o seu coeficiente de extinção molar em 280 nm (0,665).

6.4) Caracterização Química.

6.4.1) Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE).

As eletroforeses em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes (SDS) foram realizadas conforme a técnica descrita por Laemmli, 1970.

O tampão do eletrodo continha Tris 0,025M, glicina 0,192M e SDS 0,1% (m/v), pH 8.3. As amostras foram dissolvidas em Tris-HCl 0,06M pH 6.8, azul de bromofenol 0,001% (m/v), glicerol 10% (v/v) e β -mercaptoetanol 10% (v/v). As eletroforeses foram realizadas em sistema de eletroforese Hoefer SE260 Mighty Small Mini Vertical. Após a corrida os géis foram corados em uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v) em água e metanol na proporção de 1:1 (v/v) e descorados numa solução de ácido acético 7%. O peso molecular foi estimado pelo padrão de peso molecular 7L (Sigma), contendo as seguintes proteínas: Soroalbumina bovina-(66kDa), Ovoalbumina-

(45kDa), Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase-(36kDa), Anidrase Carbônica-(29kDa), Tripsinogênio-(24kDa), Inibidor de tripsina-(20.1kDa), α -lactoalbumina-(14.4kDa).

6.4.2) Sequência N-terminal.

A análise da sequência N-terminal da BP-PLA₂ foi realizada em um sequenciador automático de proteínas da Shimadzu (modelo PPSQ-23A). Uma solução com aproximadamente 200pmol da enzima foi aplicada no sequenciador e determinado pelo método de degradação de Edman (Edman e Begg, 1967). Os experimentos foram realizados no Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de São Carlos, com a colaboração da Prof. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo.

6.4.3) Focalização Isoéletrica.

A eletrofocalização da PLA₂ purificada do veneno de *Bothrops pauloensis* foi realizada segundo o método descrito por VESTEBERG, 1972, modificado como descrito a seguir. Os experimentos foram realizados no Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, com a colaboração da Prof. Dra. Eliane C. A. Braga.

a) Preparo do Gel.

O gel foi preparado a 5% (m/v) em acrilamida (bis-acrilamida 0,8: 30), contendo 10% de sacarose (m/v), 1% de Buffalyte (v/v), 0,15% de TEMED (v/v) e 0,07% de persulfato de amônio (m/v). O gel foi polimerizado em placa de vidro 12 x 14 cm com espessura de 0,14 cm. A face interna das placas foi coberta com uma folha de poliéster

(Retrophane) aderida à mesma. Uma borracha em forma de U foi colocada entre as duas placas, de modo a formar entre elas um espaço retangular de aproximadamente 14 x 12 cm com espessura de 0,8 mm. As placas foram imobilizadas verticalmente com auxílio de pinças metálicas e o espaço entre as placas preenchidas com o gel. A polimerização do gel foi feita sempre no dia anterior à eletroforese.

b) Aplicação das Amostras e Focalização Isoéletrica.

No momento do uso, as placas de vidro e uma das folhas de poliéster foram retiradas e o gel ainda sobre uma das folhas de poliéster foi colocado sobre uma placa refrigerada ligada a um banho termostatizado a 4⁰C. A placa contendo um papel milimetrado da Beckman foi previamente umedecido com glicerol, para melhor refrigeração do gel. Cinco tiras de papel Whatman n^o 3, de 2 centímetros de largura, sobrepostos foram utilizados para contactar o gel e os eletrodos de platina, sendo o cátodo embebido em uma solução de NaOH 1M e o ânodo em ácido fosfórico 1M. Os eletrodos de platina foram centralizados sobre as tiras de papel e o sistema então fechado.

A fonte de alta voltagem foi ajustada para valores máximos de 200V, 30mA e então realizada uma pré-focalização por 30 minutos.

Pedaços de papel de filtro da LKB de 1,0 x 0,5 cm foram embebidos nas amostras e colocados sobre o gel, sendo retirados após 60 minutos de focalização em 250V e 25 mA. A focalização prosseguiu por mais 2 horas a 300V e 25 a 4mA, por 1 hora a 600V e 20 a 5mA e por mais 30 minutos a 1200V e 5 a 1 mA.

c) Detecção das Proteínas e Determinação do Gradiente de pH.

Após a focalização isoeletrica, foram desprezadas 0,5 cm das laterais do gel, sendo então seccionados tiras de 1,0 x 2,0 cm do mesmo e colocados em tubos de ensaio contendo 0,2 ml de água “Millipore” para a leitura do pH após 2 horas em repouso. Estas tiras foram cortadas nas laterais do gel intercaladamente, de forma a obter valores médios de pH para cada 0,5 cm do gel.

O restante do gel contendo as amostras foi colocado em solução de ácido tricloroacético a 10% (m/v) e metanol a 50% por 15 minutos, lavado com água destilada e corado por 2 horas em solução de Coomassie Blue G-250 0,2% em água: metanol 1:1. O gel foi descorado com uma solução de metanol: ácido acético: água na proporção de 3:1: 1 (v/v/v).

6.5) Caracterização Enzimática

6.5.1) Atividade Fosfolipásica.

Foi determinado por titulação potenciométrica segundo o método descrito por De Haas *et al.*, 1968. Como substrato foi utilizada uma emulsão aquosa de gema de ovo (uma gema em 50 ml de água desionizada) em presença de desoxicolato de sódio e cloreto de cálcio, como segue: 15 ml da emulsão aquosa de gema de ovo, 10 ml de desoxicolato de sódio a 0,03M, 1 ml de cloreto de cálcio a 0,6M e o volume foi completado para 100 ml com água desionizada. Para cada ensaio foram utilizados 10 ml desta solução de trabalho e 10µg de proteínas dosadas. A liberação enzimática de ácidos graxos foi titulada com NaOH a 0,1208N. O resultado final da atividade foi calculado em µeq/mg/min de base consumida.

Por definição 1 unidade de atividade específica corresponde ao consumo de 1 microequivalente de base por mg de proteínas em um minuto.

6.5.2) Atividade Hemolítica Indireta.

A hemólise causada pelas amostras foi avaliada utilizando-se eritrócitos de camundongos suplementados com gema de ovo em gel de agarose como previamente descrito (Gutiérrez *et al.*, 1988). Para preparação do gel, extraiu-se sangue de camundongos previamente anestesiados com éter de petróleo e os eritrócitos foram lavados por 3x com PBS. Para cada gel foram adicionados 0,25g de agarose em 25ml de PBS e esta foi dissolvida por aquecimento. Posteriormente foi adicionado 0,005g de azida, 0,25g de CaCl_2 0.01M, 0,3ml de gema de ovo e 0,3ml dos eritrócitos lavados. Alíquotas de 20 μ l de solução de salina contendo 5 μ g da fosfolipase A_2 ou da peçonha bruta foram aplicadas em poços de aproximadamente 4mm de diâmetro feitos no gel. Os géis foram incubados a 37°C e os halos hemolíticos formados foram medidos em diferentes intervalos de tempo.

6.5.3) Teste de Inibição da Agregação Plaquetária.

A inibição da agregação plaquetária induzida pela fosfolipase A_2 foi determinada utilizando-se o método previamente descrito por Fuly *et al.*, 1997. A agregação plaquetária foi medida turbidimetricamente utilizando um agregômetro Z-1000 (Zenite-SPECTRA LAB) As amostras foram deixadas a 37°C em cuvetas de vidro siliconizadas utilizando 200 μ l de plasma rico em plaquetas (PRP) sob agitação, e a agregação foi iniciada após a pré-incubação por 10 minutos com 20 μ g da fosfolipase. Os controles foram

realizados utilizando-se 10µl ADP (10 mg/ml) e colágeno (110 mg/ml) como agonistas da agregação plaquetária.

6.6) Caracterização Biológica

6.6.1) Atividade Edematogênica.

Grupos de 5 camundongos Swiss (18-22g) foram injetados i.d na região subplantar da pata direita com 50µl de solução contendo 25µg peçonha bruta ou PLA₂ dissolvida em PBS. Em seguida realizava-se a medição das patas em diferentes intervalos (30', 1,2,3 horas) de tempo a partir do tempo 0h (o qual era subtraído e cada valor obtido). O aumento da área na pata dos camundongos foi medido com um paquímetro de baixa pressão 0,01mm (Mytutoyo, Japão) e expresso em porcentagem direta de edema induzido.

6.6.2) Análise Miotóxica Analisada por Dosagem de Creatina Cinase no Plasma.

Aproximadamente 20µg da fosfolipase A₂ foram inoculados no músculo gastrocnemius direito de camundongos machos Swiss (n=3 18-22g). Após 1, 3, 6 e 24 horas os animais foram sacrificados e o sangue colhido por punção cardíaca e imediatamente centrifugados a 2.500xg, por 10 minutos a 4⁰C (Laborzentrifugem 2K 15-Sigma). Os animais controles receberam somente PBS no mesmo volume que a toxina. A atividade da enzima creatina cinase foi determinada utilizando-se o Kit CK-UV cinético (Bioclin). O princípio deste método consiste nas seguintes reações: 1) na reação entre a creatina fosfato e a adenosina difosfato (ADP), catalisada pela enzima creatina cinase, formando-se a creatina e a adenosina trifosfato (ATP); 2) o ATP formado é utilizado para fosforilar a glicose, produzindo glicose-6-fosfato (G-6-P) na presença da hexoquinase; 3) a seguir a G-

6-P é oxidada a 6-fosfogliconato na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), esta reação é catalisada pela glicose-6 fosfato desidrogenase; 4) durante esta oxidação a quantidade equimolar de NAD^+ é reduzida a NADH aumentando a absorbância em 340nm. A variação em absorbância é diretamente proporcional à atividade da enzima creatina cinase. O experimento consistiu em incubar 10 μl do plasma heparinizado com 500 μl do reativo dissolvido em água destilada por 2 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$, em seguida foram realizadas leituras a 340nm nos intervalos 0 a 3 minutos. A atividade creatina cinase foi expressa em unidades/litro, constituindo uma unidade o resultado da fosforilação de um nanomol de creatina por minuto a 25 $^{\circ}\text{C}$.

6.6.3) Análise Morfológica

A evolução do dano tecidual local induzido pela peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* e pela fosfolipase A_2 foi analisada por microscopia de luz, por meio da injeção de 50 μg da peçonha bruta ou de 20 μg da fosfolipase no músculo gastrocnemius direito de camundongos da linhagem Swiss, (n=3, 18-22g). Os animais foram sacrificados após 1, 3, 6 e 24 horas após a administração das amostras. A porção central do músculo gastrocnemius foi retirada e colocada em solução fixadora (formol 10% em PBS) durante 24 horas. Após a fixação, foi realizada a desidratação em uma série de álcoois em concentrações crescentes de 50 a 100%, em seguida os tecidos foram incluídos em parafina. Os blocos obtidos foram aparados e então seccionados com auxílio de um micrótomo. Cortes de 6 μm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina, montados em lâmina e lamínula, examinados ao microscópio óptico e fotografados.

6.7) Análise Estatística

A montagem dos gráficos, cálculos das médias e desvios padrões das médias foram realizados com auxílio dos softwares Origin.

6.8) Alinhamento da Sequência N-terminal

As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustalw.

7- RESULTADOS

7.1) Cromatografia de troca-ionica em gel de CM-Sepharose Fast Flow

O fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* foi realizado em gel de CM-Sepharose Fast Flow utilizando-se um gradiente convexo de concentração em tampão bicarbonato de amônio a 0,05M pH 7.9. O perfil cromatográfico é mostrado na figura 1. A peçonha bruta foi resolvida em seis picos de absorbância a 280nm, os quais foram designados CM0, CM1, CM2, CM3, CM4, CM5.

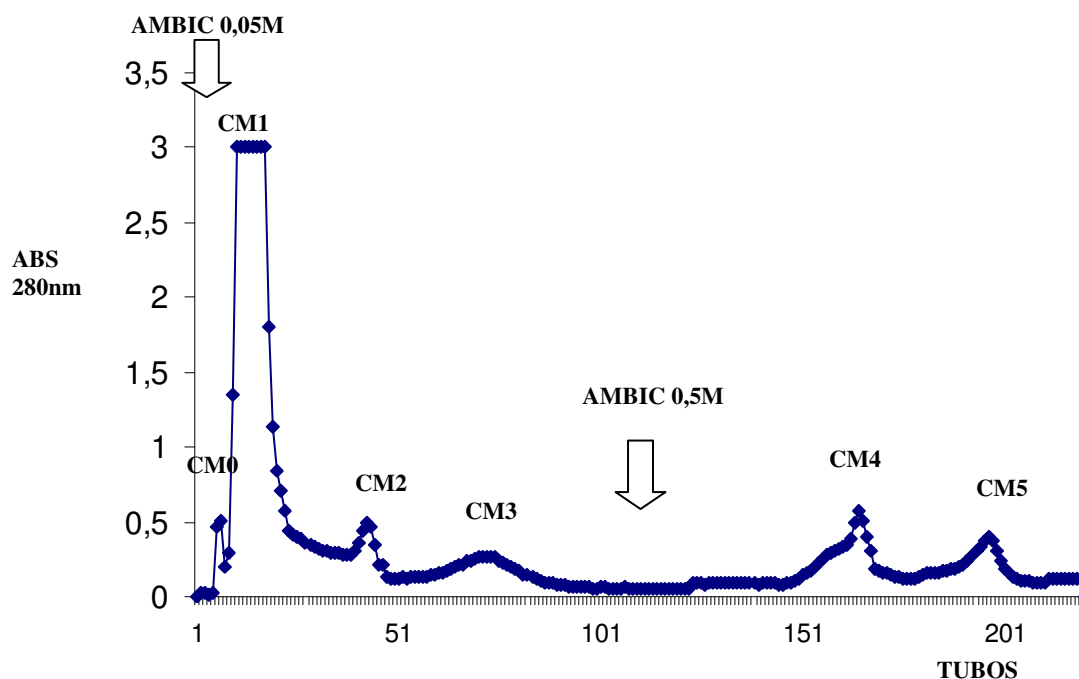


Figura 1: Perfil cromatográfico do fracionamento de 225 mg da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* em resina de troca iônica CM-Sepharose Fast Flow (2,0 x 20,0cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7,9 e então eluída em gradiente contínuo de 0,05M a 0,5M do mesmo tampão a 25°C. Frações de 3ml/tubo foram coletadas a um fluxo de 20ml/h.

7.2) Fracionamento em Gel de Phenyl-Sepharose CL-4B da fração CM1 da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*.

A fração CM1 depois de concentrada e liofilizada foi submetida em resina hidrofóbica de Phenyl-Sepharose CL-4B. O perfil cromatográfico é mostrado na figura 2. A fração P5 apresentou um pico simétrico e uma alta atividade fosfolipásica A₂ (Tabela II).

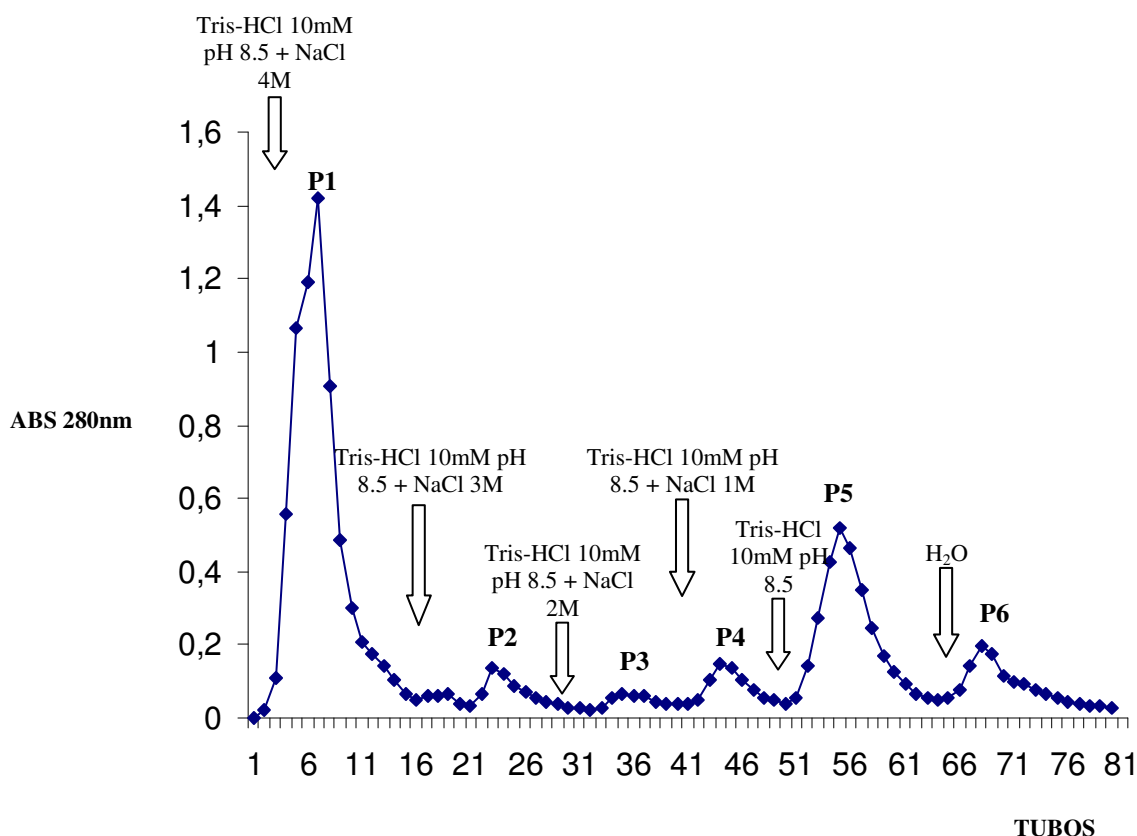


Figura 2: Cromatografia em Phenyl-Sepharose CL-4B de 100 mg da fração CM1 da peçonha de *Bothrops pauloensis*. Coluna de 20 x 1.2 cm, equilibrada com tampão Tris-HCl 10mM pH 8.5 + NaCl 4M com fluxo de 20ml/h, coletadas frações de 2,5ml/tubo. A eluição foi realizada com Tris-HCl 10mM com concentrações molares decrescentes de NaCl, finalizando a eluição com água.

7.3) Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Agentes Desnaturantes

A fração P5 obtida na cromatografia em Phenyl-Sepharose CL-4B a partir da fração CM1 apresentou uma banda majoritária, com massa molecular de aproximadamente de 15kDa em condições desnaturantes, como observado em SDS-PAGE a 14% (Figura 3).

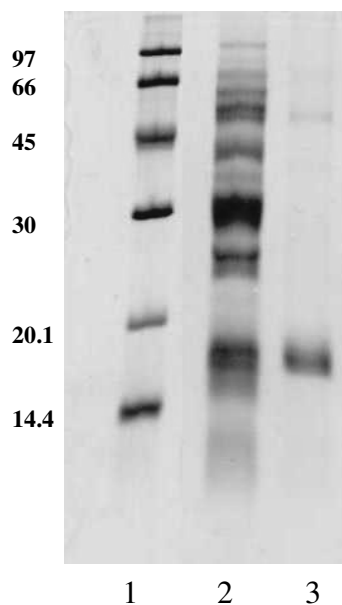


Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com condições desnaturantes. Tampão Tris-Glicina pH 8.3. tempo de corrida 80 minutos a 20mA constante e voltagem variando de 100 a 200V. Após a corrida o gel foi corado com Coomassie Blue R-250 a 2,5% por 10 minutos e em seguida descorado com ácido acético 10%, etanol 30% e água desionizada.

1- Padrão de Peso Molecular LMW (Amersham Biosciences): Fosforilase b-97kDa, Albumina-66kDa, Ovoalbumina-45kDa, Anidrase Carbônica-30kDa, Inibidor de tripsina-20.1kDa, α -lactoalbumina-14.4kDa.

2- Fração CM1

3- Fração P5

7.4) Fracionamento em Coluna de fase reversa C8 Sephasil TM da fração P5 da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*.

Cerca de 9mg da fração P5 foi cromatografada em um sistema de RP-HPLC em coluna Shimadzu C8 (2.0 x 25cm). A figura 4 mostra que a amostra P5 foi dividida em 3 picos, sendo o segundo pico de maior absorvância e o que apresentou maior atividade fosfolipásica, denominado P5b (BP-PLA₂) (Tabela II).

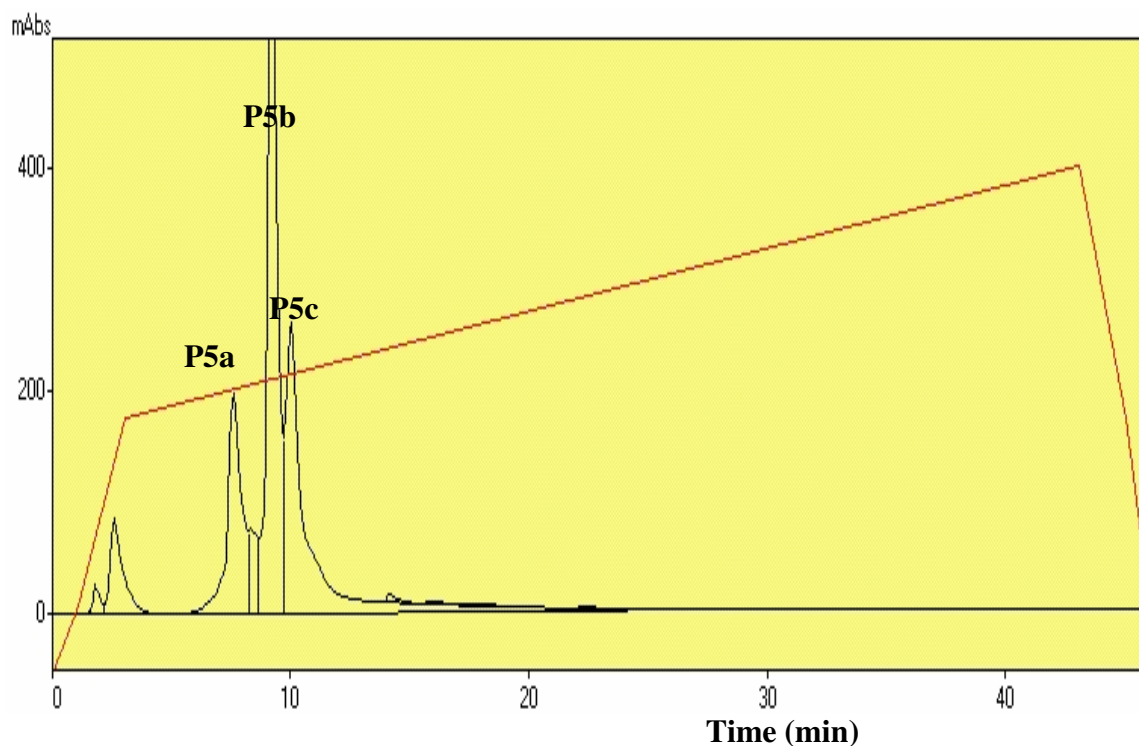


Figura 4: Perfil da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa da fração P5 em coluna Shimadzu C8. 9mg da fração P5 foram dissolvidos em 500µl do solvente A*. A amostra foi eluída com um gradiente linear de 0 a 90% do solvente B**. O pico foi eluído a um fluxo de 1ml/min. A absorbância foi monitorada a 280nm.

* Solvente A: 0,1% de TFA.

** Solvente B: 0,1% de TFA e 90% de acetonitrila.

7.5) Recuperação protéica das frações obtidas nos passos de purificação da fosfolipase BP-PLA₂ da peçonha de *Bothrops pauloensis*.

Na tabela II está representada a recuperação protéica pelo método do microbiureto, das frações obtidas a partir do fracionamento em CM-Sepharose da peçonha de *Bothrops pauloensis*. Como pode ser observada, a recuperação total de proteínas após o primeiro passo foi de 62% sendo que destes 48% correspondem a fração CM1. A fração P5 resultante do segundo passo de purificação apresentou cerca de 7,5% e 17% de recuperação protéica e de atividade fosfolipásica respectivamente em relação à fração CM1. Por outro lado quando a fração P5 é submetida ao sistema de RP-HPLC há um aumento considerável da recuperação protéica (52%) e de atividade PLA₂ (65%).

Tabela II: Rendimento proteico e de atividade PLA₂ das frações obtidas no fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* em CM-Sepharose, Phenyl-Sepharose CL-4B e HPLC.

Fração	Proteína		Atividade Fosfolipásica		
	mg	%Rec	U-mg	U-total	%Rec
Bp	225	100	63	14.175	100
Passo 1: CM-Sepharose					
CM0	2,8	1,2	0.0	0.0	0.0
CM1	108	48	122	13.176	92.9
CM2	5,2	2,3	0.0	0.0	0.0
CM3	8,4	3,7	0.0	0.0	0.0
CM4	9,1	4,0	0.0	0.0	0.0
CM5	6,3	2,8	83	522.9	3.6
TOTAL	139,9	62	---	13.698,9	96.5
Passo 2: Phenyl-Sepharose CL-4B					
CM1	80	100	122	13.176	100
P1	15,4	19.2	52.3	805.4	6.11
P2	10,3	12,8	75	772.5	5.86
P3	4,7	5,8	83	390.1	2.96
P4	9,6	12	52	499.2	3.78
P5	9	7,5	253	2.277	17.28
P6	7,5	9,3	43	322.5	2.44
TOTAL	56,5	66.6	--	5.066.7	38.43
Passo 3: RP-HPLC					
P5	9	100	253	2.277	100
P5a	0.8	8.8	0.0	0.0	0.0
P5b	4.7	52.2	315.3	1481.9	65
P5c	2.9	32.2	54.7	158.6	6.9
TOTAL	8.4	93.2	---	1640.5	71.9

7.6) Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Agentes Desnaturantes para Determinação da Massa Molecular.

Na figura 5 observa-se o perfil eletroforético em gel de poliacrilamida PAGE-SDS a 14% da BP-PLA₂ obtida na cromatografia em sistema de RP-HPLC em coluna Shimadzu C8. O peso molecular aproximado da fosfolipase A₂ foi obtido pela curva padrão traçada considerando-se a distância de migração em função dos valores de massas moleculares das proteínas utilizadas como padrões. O peso molecular da BP-PLA₂ na presença de β -mercaptoetanol foi de 15.8 KDa.

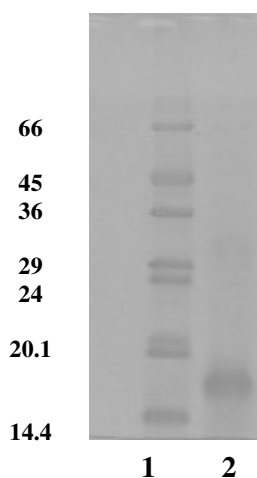


Figura 5: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes. Tampão Tris-Glicina pH 8.3. tempo de corrida 80 minutos a 20mA constante e voltagem variando de 100 a 200V. Após a corrida o gel foi corado com Coomassie Blue R-250 a 2,5% por 10 minutos e em seguida descorado com ácido acético 10%, etanol 30% e água desionizada. **1-** Padrão de Peso Molecular 7L (Sigma): Soroalbumina bovina-66kDa, Ovoalbumina-45kDa, Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase-36kDa, Anidrase Carbônica-29kDa, Tripsinogênio-24kDa, Inibidor de tripsina-20.1kDa, α -lactoalbumina-14.4kDa. **2-** BP-PLA₂.

7.7) Focalização Isoéletrica

Como pode ser observado no gráfico abaixo o pI apresentou valor de 4.34 mostrando-se assim uma proteína de caráter bastante ácido.

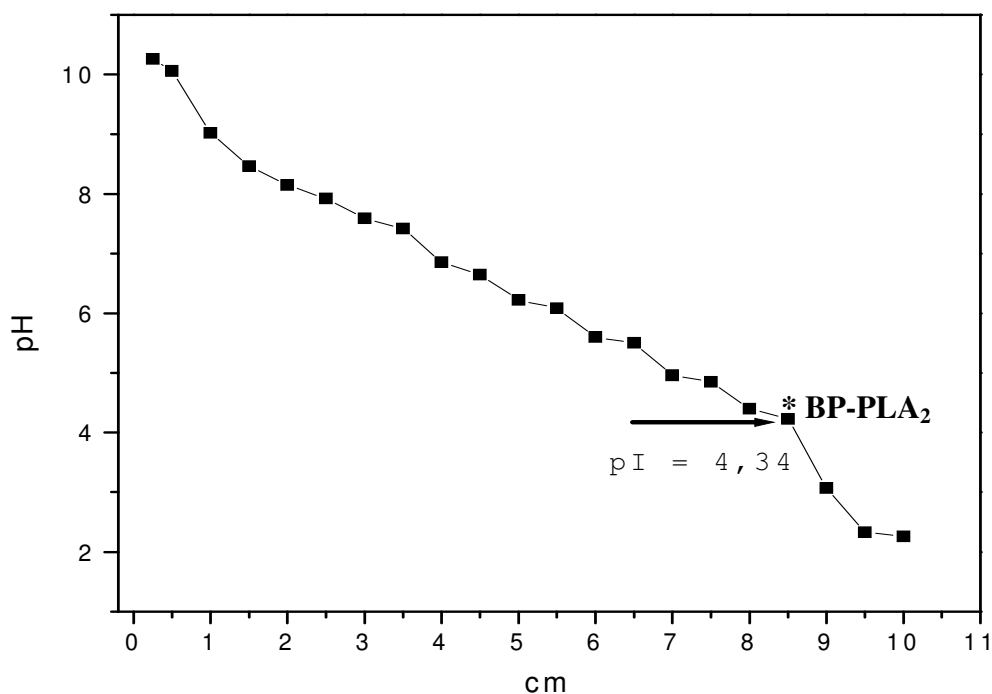


Figura 6: Curva padrão para a determinação do ponto isoelétrico da BP-PLA₂. Após a focalização isoelétrica, foram desprezados 0,5cm das laterais do gel, sendo então seccionados tiras de 1.0 x 2.0 cm do mesmo e colocados em tubos de ensaio contendo 0,2ml de água “Millipore” para a leitura do pH. Os valores de pH obtidos foram utilizados para traçar a curva em função da distância de migração.

* O valor de pI encontrado foi estimado por interpolação na curva padrão.

7.8) Seqüência N-Terminal da BP-PLA₂ de *Bothrops pauloensis*.

A seqüência N-Terminal da BP-PLA₂ foi realizada com o intuito de se comparar à seqüência obtida com as demais PLA₂ isoladas de peçonhas ofídicas já seqüenciadas. O N-Terminal apresentou a seguinte seqüência obtida em 15 ciclos:

Asn-Leu-Val-Gln-Phe-Lys-Thr-Leu-Ile-Met-Lys-Ile-Ala-Gly-Arg

7.9) CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E BIOLÓGICA

7.9.1) Atividade Fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi determinada em triplicata por titulação pontenciométrica. Podemos observar a atividade fosfolipase A₂ mostrou-se aumentada à medida que os passos de purificação foram realizados, mostrando assim que o processo de purificação da proteína BP-PLA₂ foi satisfatório.

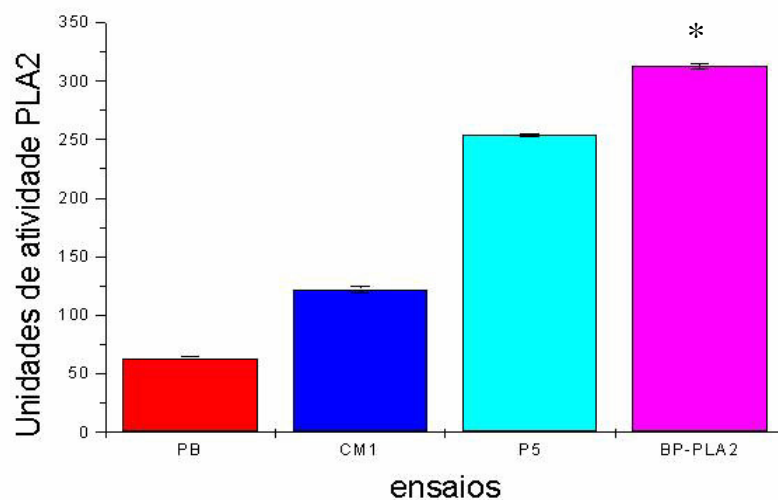


Figura 7: Perfil comparativo da atividade fosfolipásica da peçonha bruta (PB) de *Bothrops pauloensis* e frações, realizadas sobre a gema de ovo com 10µg de proteína. As amostras foram adicionadas ao substrato de reação pH 8.0 e titulados com NaOH 0,1208N durante 3 minutos à temperatura ambiente. Os resultados foram apresentados pela média $\pm$ SD (n=3).

7.9.2) Atividade Hemolítica Indireta:

A atividade hemolítica de 5 μ g da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* ou da BP-PLA₂ é apresentado na figura 8. Como pode ser observado, ambas as amostras foram capazes de induzir hemólise nos tempos determinados de 3, 6, 12 e 24 horas, no entanto em todos os intervalos analisados a enzima BP-PLA₂ foi consideravelmente mais ativa.

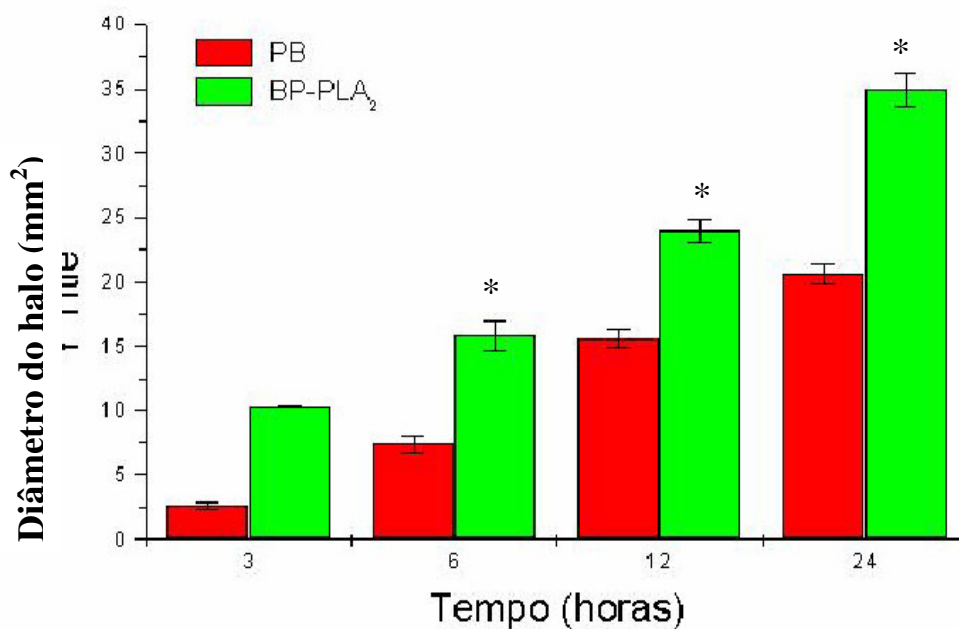


Figura 8: Atividade hemolítica da peçonha bruta (PB) de *Bothrops pauloensis* ou BP-PLA₂. 5 μ g das amostras foram aplicados sobre a placa de petri contendo como substrato gema de ovo e eritrócitos em seguida realizava-se a medição dos halos em diferentes intervalos (3, 6, 12 e 24 horas) de tempo. Os resultados foram apresentados pela média $\pm$ SD (n=3).

7.9.3) Atividade de Agregação Plaquetária:

Como pode ser observado na figura 9, os agonistas plaquetários ADP e colágeno (controles positivos da reação) foram capazes de induzir aproximadamente 80% de agregação plaquetária após 3 e 4 minutos de reação respectivamente. No entanto quando o PRP foi pré-incubado com a BP-PLA₂ por 10 minutos e acrescentado posteriormente o colágeno, a agregação plaquetária foi drasticamente reduzida, fato este não observado quando acrescentou posteriormente o ADP.

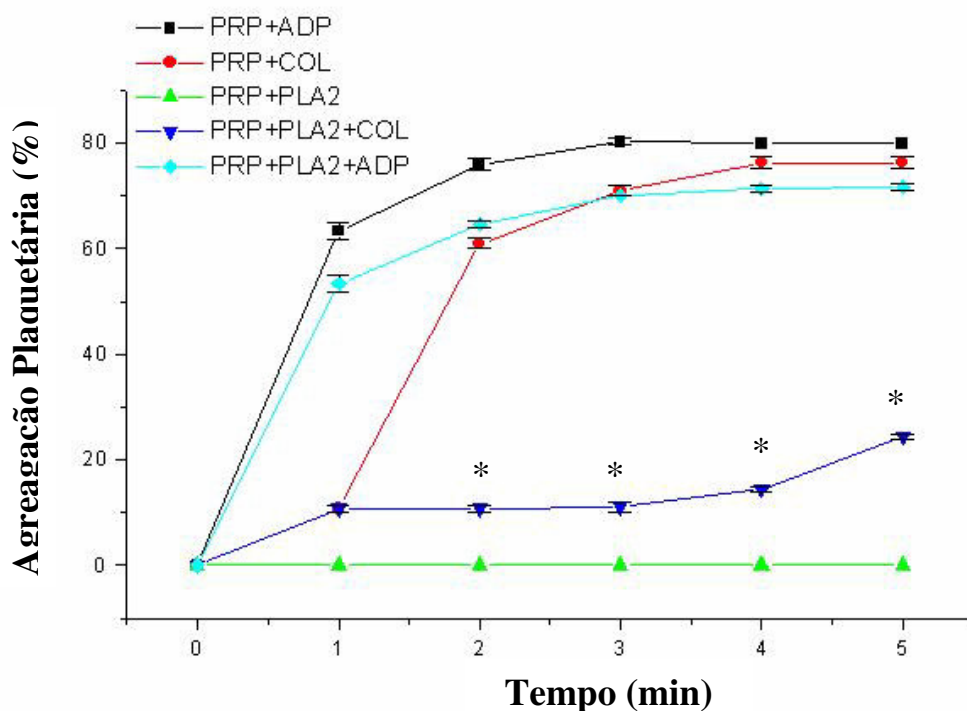


Figura 9: Atividade de agregação plaquetária da BP-PLA₂ da peçonha bruta (PB) de *Bothrops pauloensis*. 20µg da amostra foram pré-incubados por 10' com "PRP" (plasma rico em plaquetas). Após este intervalo 10µl dos agonistas colágeno ou ADP foram adicionados ao meio. Durante os primeiros 5' de reação foi quantificada a porcentagem de agregação plaquetária. Os resultados foram apresentados pela média ±SD (n=3).

7.9.4) Atividade Edematogênica

Como pode ser observada na figura 10, a peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* foi capaz de induzir cerca de 65% de edema após 1 hora de injeção, já BP-PLA₂ foi capaz de induzir aproximadamente 90% de edema na pata do camundongo no mesmo tempo, apresentando uma atividade máxima.

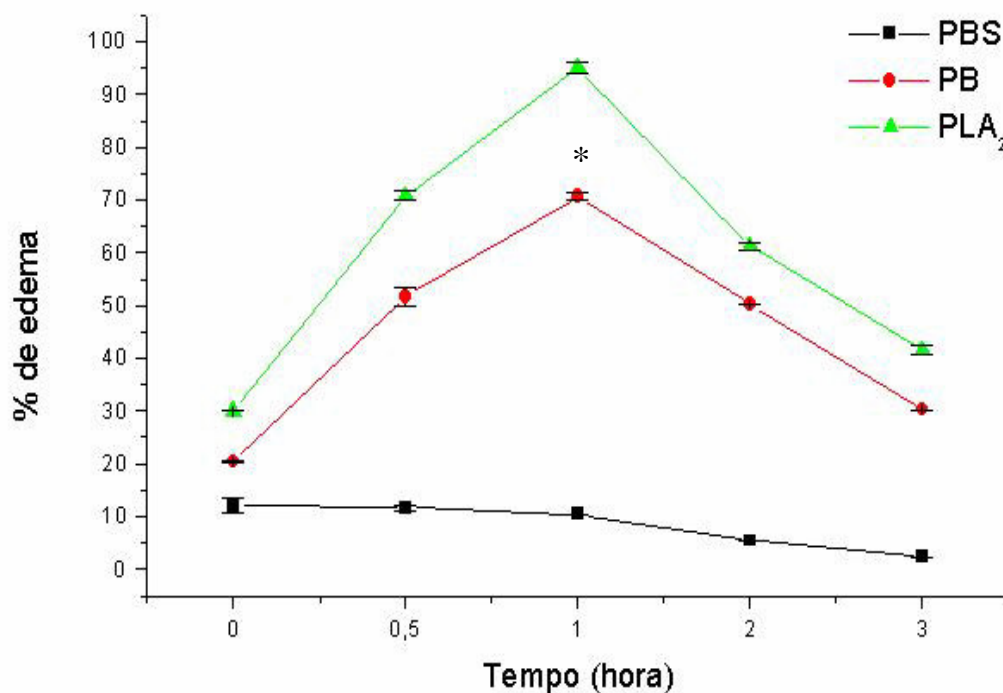


Figura 10: Indução de edema tempo-dependente em pata de camundongos foi medida após injeção de 25µg/50µl da peçonha bruta (PB) de *Bothrops pauloensis* ou BP-PLA₂. O aumento da área da pata foi medida com um paquímetro e expressa em porcentagem de edema induzido. Os resultados foram apresentados pela média ±SD (n=5).

7.9.5) Atividade Miotóxica (CK)

Atividade miotóxica foi realizada por dosagem dos níveis de creatina quinase no plasma de animais inoculados com 50µg da peçonha bruta ou BP-PLA₂. Como apresentado na figura 11 nota-se um significativo aumento na liberação de creatina cinase, quando comparada ao controle PBS. Níveis máximos de CK foram observados após 1 hora de injeção da PLA₂ correspondendo a 863,46 U/L, já os valores máximos observados para a peçonha bruta correspondem a 509,98 U/L após 3 horas de injeção. A atividade CK para o grupo controle foi de aproximadamente 65 U/L.

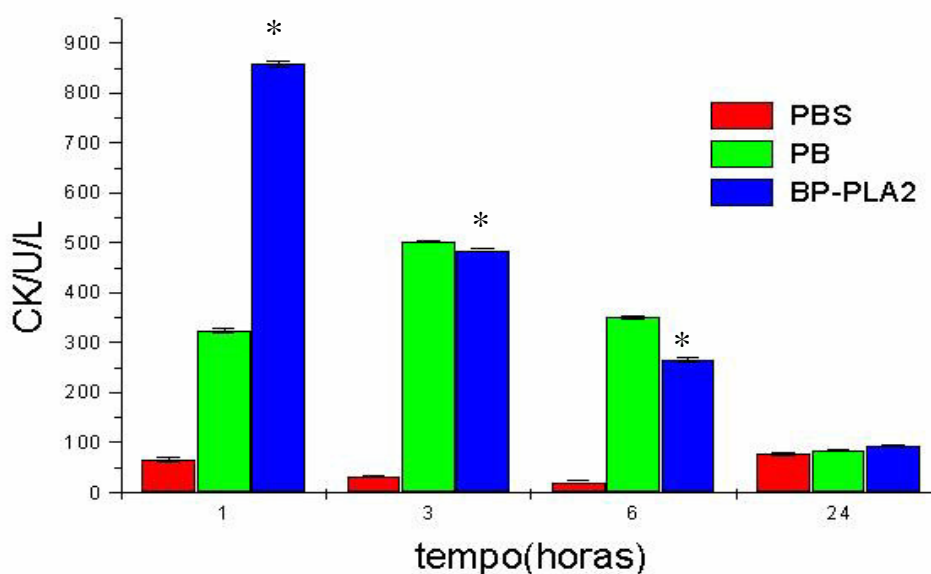
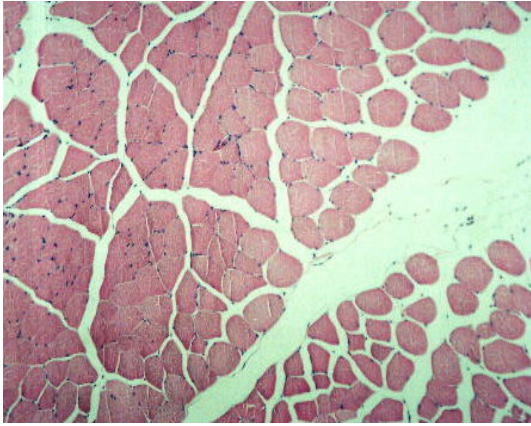


Figura 11: Níveis plasmáticos de creatina cinase (CK) obtido do plasma de camundongos injetados com 50µg da peçonha bruta (PB) de *Bothrops pauloensis* ou BP-PLA₂ no músculo gastrocnêmio sacrificados após 1, 3, 6 e 24 horas. Animais injetados com 50µl de PBS foram utilizados como controle. A atividade foi expressa em U/L. Os resultados foram apresentados pela média $\pm$ SD (n=3).

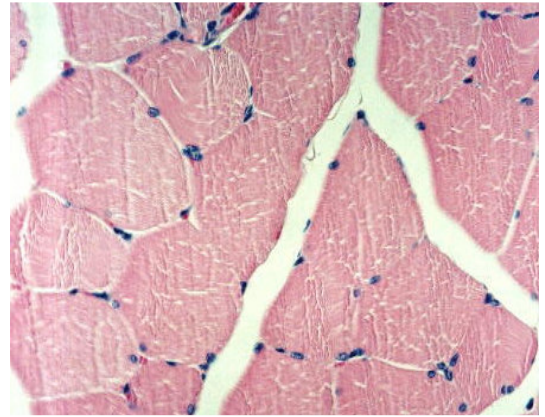
7.9.6) Alterações Morfológicas Induzidas pela Peçonha Bruta de *Bothrops pauloensis* e BP-PLA₂.

A figura 12 apresenta as alterações morfológicas da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* ou de sua respectiva fosfolipase A₂ (BP-PLA₂) sobre o músculo gastrocnemius direito de camundongos, após 24 horas de inoculação. A peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* causou uma evidente ação hemorrágica nas primeiras 24 horas de injeção. Logo em seguida, observamos o aparecimento gradativo de alterações teciduais e uma evidente concentração de células do exudato inflamatório (Figura 12 C e D).

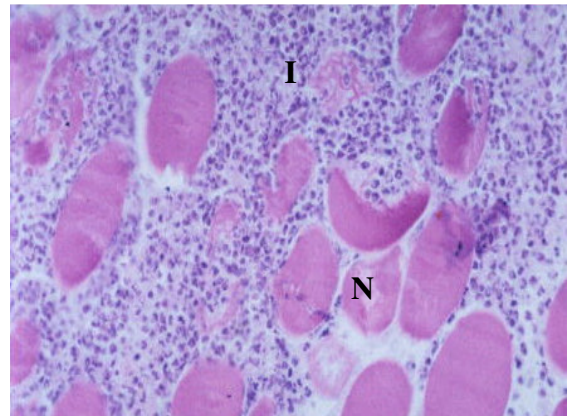
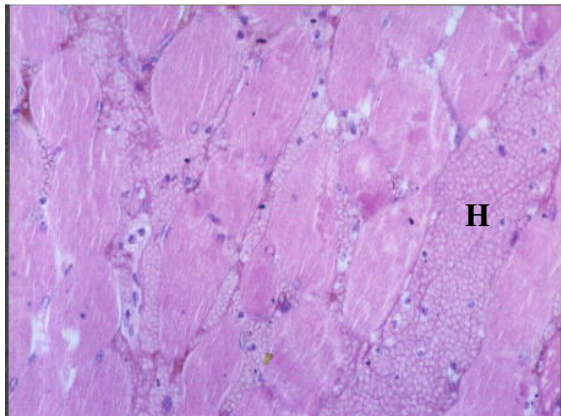
A fosfolipase A₂ ácida BP-PLA₂ 20µg também foi capaz de induzir lesão nas fibras musculares. Estas apresentaram degradadas após 24 horas de administração da toxina, observamos ainda a presença de edema entre as células musculares, algumas células necrosadas e uma alta concentração de exudato inflamatório (Figura 12 E e F).



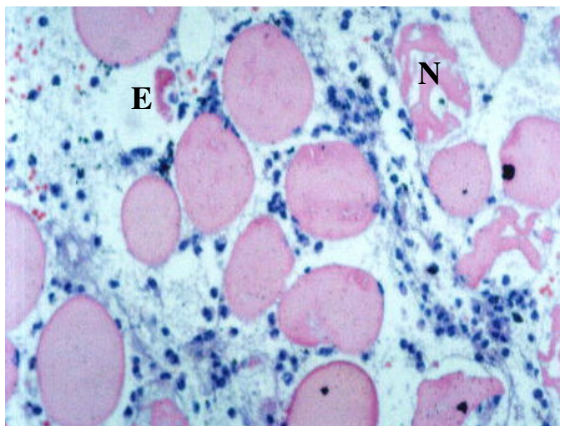
A



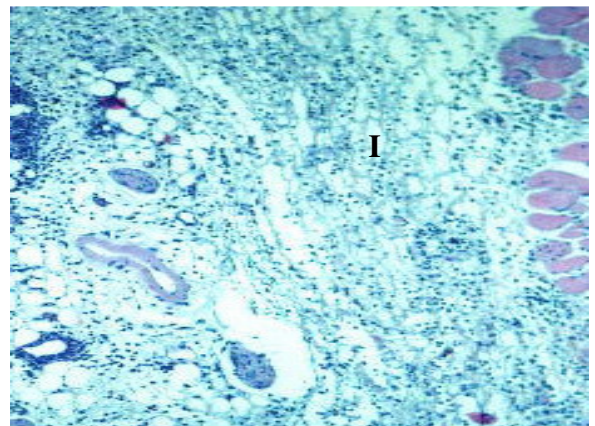
B



D



E



F

Figura 12: Fotomicrografia de cortes finos transversais com 6,0 µm de espessura do músculo gastrocnemius direito de camundongos, após 24 horas de inoculação. As alterações foram induzidas por 50µg da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* e 20µg da fosfolipase BP-PLA₂ dissolvidos em 50µl de PBS. Aumento de 400x.

A-B -Controle (PBS)

C-D -Peçonha Bruta de *Bothrops pauloensis* (24 horas)

E -F -BP-PLA₂ (24 horas)

H = Hemorragia

I = Infiltrado leucocitário

N= Necrose

E= Edema

Tabela III: Alinhamento da sequência N-terminal dos primeiros resíduos da BP-PLA2 com outras sequências de PLA₂s ácidas e básicas isoladas de peçonhas ofídicas.

BP-PLA2 ¹	N	L	V	Q	F	K	T	L	I	M	K	I	I	A	G	R	16
SIIISPIIA ²	S	L	W	Q	F	G	K	M	I	D	Y	-	V	M	G	-	14
SIIISPIIB ²	S	L	W	Q	F	G	K	M	I	F	Y	-	T	G	K	-	14
SIIISPIIIA ²	S	L	W	Q	F	G	K	M	I	L	Y	-	V	M	G	-	14
SIIISPIIIB ²	S	L	W	Q	F	G	K	M	I	F	Y	-	E	M	T	-	14
LM-PLA2I ³	H	L	L	Q	F	E	Q	L	I	R	K	-	I	A	G	-	14
LM-PLAII ³	H	L	L	Q	F	G	D	L	I	D	K	-	I	I	A	-	14
Bneu-P1 ¹	N	L	V	Q	F	E	T	L	I	M	M	-	I	A	R	-	14
Bneu-P2 ¹	S	L	V	Q	F	E	T	L	I	M	M	-	I	A	G	-	14
Bneu-P3 ¹	N	L	V	Q	F	E	T	L	I	M	K	-	I	A	G	-	14
BnSP7 ⁴	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	-	E	T	G	K	15
Bnp-TXI ⁴	D	L	W	Q	F	G	K	M	I	L	K	-	V	A	G	K	15
Bnp-TXII ⁴	S	L	W	E	F	A	Q	M	I	L	E	-	E	T	K	R	15
APLA2 ⁵	S	L	V	Q	F	E	T	L	I	M	R	-	I	A	C	R	15
	*											*					

1- Fosfolipases A₂ Ácidas isoladas da peçonha de *Bothrops pauloensis*.

2- Fosfolipases A₂ Ácidas isoladas da peçonha de *Bothrops jararacussu*.

3- Fosfolipases A₂ Ácidas isoladas da peçonha de *Lachesis muta*.

4- Fosfolipase A₂ Básica isolada da peçonha de *Bothrops neuwiedi*.

5- Fosfolipase A₂ ácida isolada da peçonha de *Agkistrodon shedaensis Zhao*

Sequência deduzida a partir do cDNA

* Consenso.

8-DISCUSSÃO

Os venenos de serpentes apresentam várias toxinas, sendo as fosfolipases A₂ um dos seus componentes principais. Estas têm sido bastante estudadas juntamente com sua atividade enzimática e efeitos farmacológicos. Muitos destes estudos farmacológicos com proteínas e peptídeos ativos de peçonhas de serpentes têm seu enfoque no isolamento, caracterização e elucidação de sua estrutura através de métodos bioquímicos clássicos.

As fosfolipases A₂ das peçonhas de serpentes podem ser facilmente purificadas, sendo que muitas destas enzimas já foram completamente sequenciadas, clonadas e suas estruturas resolvidas por cristalografia de raios-X.

A qualidade das preparações das amostras é crucial para os estudos mecanísticos de estrutura e função. Qualquer contaminante pode contribuir significativamente dificultando a obtenção e interpretação de um resultado. Assim várias fosfolipases A₂ das peçonhas botrópicas tem sido purificadas utilizando uma complexa combinação de métodos cromatográficos como: gel-filtração, troca iônica, RP-HPLC, afinidade usando inibidores naturais como anticorpos e heparina (Gutierrez e Lomonte, 1997; Danielle *et al.*, 1995,1997; Soares *et al.*, 1998; 2002; Geoghegan *et al.*, 1999; Ownby *et al.*, 1999).

O fracionamento da peçonha de *Bothrops pauloensis* em gel de CM-Sepharose Fast Flow apresentou seis picos de absorbância a 280nm, os quais foram designados CM0 a CM5 (figura 1). Posteriormente, a fração CM1 foi submetida a um sistema de ultrafiltração AMICON (YM30. 000) e posteriormente (YM10. 000), com o objetivo de concentrar na amostra proteínas com massas moleculares entre 10.000 a 30.000 Da para em seguida serem submetidas à purificação em gel de Phenyl-Sepharose CL-4B. Esta resina tem a

capacidade de se ligar a proteínas de caráter hidrofóbico e estas são eluídas no final do fracionamento quando lava-se a coluna com água. O perfil cromatográfico apresentou seis picos denominados P1 a P6, sendo que a fração P5 apresentou um pico mais simétrico e expressou uma boa atividade fosfolipásica de aproximadamente 253U/mg (Tabela1). Esta fração foi submetida em um sistema de RP-HPLC com o intuito de se avaliar o grau de pureza e de se obter essa fração mais pura para se procederem com os ensaios de caracterização química. A fração P5b, posteriormente denominada de BP-PLA₂, apresentou uma massa molecular estimada por SDS-PAGE de 15.8 kDa e um ponto isoelétrico de 4,34. Esta fração apresentou uma boa recuperação da atividade fosfolipásica (315U/mg) sendo esta 5 vezes maior do que a atividade apresentada pela peçonha total (63U/mg).

Daniele *et al.*, 1995 isolaram duas isoformas P1 e P2 da peçonha de *Bothrops neuwiedi*, estas apresentaram peso molecular aparente de 15 e 16.2 kDa e ponto isoelétrico de 4.8 e 4.6 respectivamente. Ambas as enzimas mostraram ser proteínas de caráter ácido, em concordância com dados obtidos de fosfolipases A₂ isoladas de outras peçonhas de serpentes botrópicas (Vidal e Stoppani, 1971).

A sequência N-terminal dos primeiros quinze resíduos de aminoácidos da BP-PLA₂ apresentou uma alta similaridade com fosfolipases A₂ enzimaticamente ativas isoladas de peçonhas ofídicas (Tabela III). Alguns resíduos de aminoácidos são altamente conservados como Leu-2, Phe-5 e Ile-9.

Com base na sequência completa da fosfolipase A₂ ácida isolada da peçonha de *Agkistrodon shedaoenzin Zhao*, (Qian Jin *et al.*, 2004) deduzida a partir do sequenciamento de seu cDNA, pode-se inicialmente sugerir que as PLA₂s ácidas apresentam uma alta similaridade da estrutura primária com fosfolipases A₂ básicas cataliticamente ativas, apresentando o resíduo Asp na posição 49, a His 48 e os três aminoácidos requeridos para a ligação com o íon Ca⁺⁺ Tyr 28, Gly 30 e Gly 32. A sequência completa de algumas PLA₂s ácidas já foram determinadas e estão disponíveis no (http://sdmc.lit.org.sg/Templar/DB/snaketoxin_PLA2/index.html).

Rodrigues *et al* 1998 e posteriormente Soares *et al* 2000 foram os pioneiros no isolamento e caracterização estrutural de PLA₂s básicas da peçonha de *B. neuwiedi pauloensis*, agora reclassificada como *Bothrops pauloensis* Silva (2000). Eles isolaram duas miotoxinas com estrutura de PLA₂ Lys-49 denominadas BnSP6 e BnSP7, que são enzimas cataliticamente inativas sobre substratos artificiais, mas apresentam evidente atividade miotóxica e edematogênica. Alquilação da BnSP7 com BPB, fez com que alguns efeitos fossem reduzidos como miotoxicidade, bloqueio neuromuscular, edema, rompimento de lipossomos e atividade bactericida. Recentemente Rodrigues *et al* 2004 isolaram dessa mesma peçonha duas fosfolipases A₂ Asp-49 (BnpTX-I e BnpTX-II) ambas com atividade miotóxica “*in vivo*”, citotoxicidade “*in vitro*” e atividade edematogênica. Estudos de modificação com a BnpTX-I mostraram que as atividades fosfolipásicas, anticoagulante, miotóxicas, neurotóxicas, e edematogênica foram abolidas, sugerindo assim que a atividade enzimática esta interligada diretamente com os efeitos farmacológicos dessa enzima.

As fosfolipases A₂ foram identificadas como fatores hemolíticos por Martin, (1896 apud Gans, 1975), porém Hughes 1935 apud Gans 1978, relatou que a atividade de hemólise das peçonhas de serpentes nem sempre está relacionada com a ação das fosfolipases A₂. No entanto outros fatores na peçonha podem agir sinergicamente com essas enzimas. Usualmente as fosfolipases A₂ apresentam atividade hemolítica indireta, pois elas promovem hidrólise de lecitinas em lisolecitinas que são componentes capazes de lisar a membrana dos eritrócitos (Ketelhut *et al.*, 2003). No presente trabalho, verificou-se que tanto a peçonha bruta quanto a BP-PLA₂ foram capazes de induzir hemólise in vitro. O aumento dessa atividade foi tempo-dependente sendo que a BP-PLA₂ induziu hemólise quase duas vezes mais que a peçonha bruta nos mesmos intervalos de tempo (Figura 8).

Ketelhut *et al.*, 2003 isolaram quatro fosfolipases A₂ ácidas da peçonha de *Bothrops jararacussu* denominadas SIIISPIIA, SIIISPIIB, SIIISPIIIA e SIIISPIIIB, estas toxinas apresentaram alta atividade catalítica, exceto SIIISPIIIB que apresentou uma baixa atividade catalítica, mas foi a única capaz de induzir hemólise indiretamente. Outros trabalhos demonstraram a habilidade da PLA₂ ácida da peçonha de *Lachesis muta* (LMPLA₂-II) em de induzir hemólise indireta e um pronunciado efeito miotóxico (Fuly *et al.*, 2002).

Sabe-se que as fosfolipases A₂ são capazes de induzir uma grande variedade de efeitos farmacológicos, incluindo efeitos característicos que promovem o desequilíbrio da hemostasia. Algumas fosfolipases A₂ podem interferir na função plaquetária (Fuly *et al.*, 2004) e estas são classificadas em dois grupos distintos: classe A que são as enzimas que apresentam efeitos bifásicos na agregação plaquetária. Em baixas concentrações e curtos períodos de incubação, estas enzimas induzem agregação plaquetária, enquanto que em

altas concentrações e grande períodos de incubação, estas inibem agregação plaquetária. Tanto para a indução quanto inibição da agregação plaquetária por estas enzimas ocorre a liberação de ácido araquidônico. Classe B que são as enzimas que inibem, mas não iniciam a agregação plaquetária. A atividade antiplaquetária destas enzimas parece ser independente da atividade enzimática, um exemplo é uma fosfolipase A₂ da peçonha de *Trimeresurus gramineus* (Ouyang *et al.*, 1983; Huang *et al.*, 1984) que age em uma etapa final comum da adesão intercelular entre plaquetas ativadas. Os diferentes efeitos farmacológicos destes dois grupos sugerem a presença de moléculas alvo distintas na superfície das plaquetas e no sítio farmacológico destas enzimas.

Através da análise da figura 9 podemos observar que os agonistas plaquetários ADP e colágeno induziram agregação plaquetária após o primeiro minuto da reação, quando incubados com o PRP (plasma rico em plaquetas - controles da reação). Após incubação da BP-PLA₂ com PRP por 10 minutos e posteriormente acrescentado colágeno houve uma queda drástica na agregação plaquetária, fato não observado quando foi acrescentado ADP, mostrando assim que esta enzima é mais específica para colágeno e não para ADP. A diferença no modo de ação das enzimas sugere a presença de distintas moléculas alvo na superfície das plaquetas e sítios farmacológicos separados na estrutura das fosfolipases A₂ (Kini, 2003).

Algumas PLA₂s de peçonhas ofídicas possuem a capacidade de inibir a agregação plaquetária. Alguns experimentos indicam que fosfolipases ácidas podem interagir com a membrana plaquetária, levando a um aumento na concentração de AMPc, e dessa forma inibindo a agregação plaquetária induzida por vários agonistas. Outros experimentos têm demonstrado que a inibição da agregação plaquetária parece ser independente da atividade

catalítica (Huang et al. 1984), sugerindo que um sítio funcional para a inibição da agregação plaquetária é separado do sítio catalítico.

Wang et al. em 1996, utilizando dados cristalográficos obtidos da estrutura da PLA₂ ácida de *A. halys pallas* demonstraram que há um domínio aromático na superfície dessa enzima, constituído pelos resíduos Phe20, Trp21, Phe113 e Trp119 associado com dois resíduos ácidos Glu 6 e Asp 115 que funcionaria como um domínio de ligação e poderia estar envolvido com a inibição da agregação plaquetária. Ao contrário da maioria das PLA₂s ácidas, as PLA₂s neutras e básicas da mesma peçonha não inibem a agregação plaquetária, provavelmente por estas não apresentarem os resíduos aromáticos citados acima, além de alguns resíduos carregados negativamente nas posições 6, 67, 115 e 130. É interessante que estudos adicionais de análises estruturais, modificações químicas e mutagênese sítio dirigida sejam realizados para identificarem o sítio responsável pela inibição da agregação plaquetária bem como a identificação de seu alvo na superfície das plaquetas.

A fosfolipase A₂ ácida BP-PLA₂ isolada neste trabalho, foi capaz de induzir a formação de edema em patas de camundongos (figura 10) de forma rápida na primeira hora e posteriormente diminuindo após 3 horas. As peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* induzem edema local em humanos e em animais experimentais (Gutierrez *et al.*, 1986). O desenvolvimento de edema é uma característica comum em resposta inflamatória cutânea e é dependente no sinergismo entre mediadores que aumentam a permeabilidade vascular e que aumentam o fluxo sanguíneo.

O mecanismo pelo qual as fosfolipases A₂ cataliticamente ativas induzem edema pode ser explicado pela hidrólise de fosfolipídeos provavelmente devido à liberação de

precursores para a biossíntese de uma grande variedade de eicosanóides e fatores ativadores de plaquetas. A liberação de aminas pelas células mastocitárias foi proposta como um possível mecanismo do edema induzido pelas PLA₂ (Landucci *et al.*, 1998; 2000).

As fosfolipases ácidas SIIISPIIB e SIIISPIIB apresentaram atividade edematogênica tempo-dependente, sendo a última, SIIISPIIB cataliticamente menos ativa, sugerindo que este efeito edematogênico não esteja relacionado com a atividade catalítica (Ketelhut *et al.*, 2003). Estudos têm sido direcionados na tentativa de se compreender os mecanismos envolvidos no edema induzido por estas peçonhas e seus principais constituintes, as fosfolipases A₂ miotóxicas (Lomonte *et al.*, 1993; Chaves *et al.*, 1995; 1998; Landucci *et al.*, 1998; 2000).

A ação da BP-PLA₂ sobre o músculo gastrocnemius foi primeiramente avaliada pela dosagem plasmática de creatina quinase. A creatina quinase é um marcador intracelular, liberado na maioria das vezes em resposta a uma lesão celular (Gutierrez & Lomonte, 1989). A fosfolipase A₂ da peçonha de *Bothrops pauloensis* induziu um aumento significativo nos níveis plasmáticos de creatina quinase após 1 hora de injeção da toxina, alcançando níveis de 863,46U/L. A atividade CK para os grupo controle foi de aproximadamente 65U/L (figura 11). A dosagem de creatina quinase nos forneceu apenas um indicativo de lesão tecidual, sendo necessários estudos morfológicos estruturais para uma análise mais detalhada.

Análises de microscopia de luz após a injeção de 50µg da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* revelaram uma evidente ação hemorrágica nas primeiras 24 horas de injeção da peçonha bruta. A fosfolipase A₂ ácida BP-PLA₂ 20µg também foi capaz de induzir lesão nas fibras musculares. Estas apresentaram degradadas após 24 horas de

administração da toxina (figura 12 E). A ação tóxica de PLA₂s ácidas de peçonhas foi primeiramente verificada por Nisenbom *et al.*, em 1986, que demonstraram que a PLA₂ ácida de *Bothrops alternatus* foi capaz de causar danos severos em alguns tecidos como fígado (congestão e uma excessiva concentração de células necrosadas), pulmão (hemorragia), coração (hemorragia e necrose interfibrilar), rim (necrose glomerular e tubular).

Ketelhut *et al.*, 2003 isolaram quatro fosfolipases A₂ ácidas da peçonha de *Bothrops jararacussu* e estas apresentaram atividade miotóxica tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Este efeito observado, não está correlacionado com a atividade cataáltica, favorecendo a hipótese que miotoxicidade é consequência de uma ação indireta das fosfolipases A₂, que conduzem no aumento de íons Ca²⁺⁺ e ativação de proteases extracelulares.

A presença de edema e um aumento considerável de infiltrado leucocitário entre as fibras e permeando o interior de algumas fibras necróticas também foi uma característica marcante após a inoculação da enzima BP-PLA₂ (figura 12 E-F). Os leucócitos desempenham papel essencial na defesa do organismo e são mediadores chaves da resposta inflamatória. O recrutamento destas células é um evento descrito para a maioria das peçonhas botrópicas. A reação local subsequente ao envenenamento leva ao estabelecimento da lesão devido à ação direta dos componentes da peçonha e/ou ação de mediadores endógenos que promovem o recrutamento de específicas populações de leucócitos (Carneiro *et al.*, 2002). Estudos realizados com as peçonhas de *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca* mostraram que os neutrófilos são as primeiras células a migrar em direção ao local afetado, enquanto que as células mononucleadas aparecem após 48 horas de administração da peçonha (Zamuner *et al.*, 2001).

Vários estudos vêm sendo realizados com o objetivo de relacionar a estrutura e função de enzimas de peçonhas ofídicas, bem como os apresentados neste trabalho. Estes tentam buscar uma melhor caracterização dos principais componentes dessas peçonhas, dentre eles, as fosfolipases A_2 que são responsáveis por vários efeitos tóxicos do envenenamento.

9 - CONCLUSÃO

A fosfolipase A₂ ácida (BP-PLA₂) da peçonha de *Bothrops pauloensis* é uma toxina que apresenta peso molecular de 15.8KDa, pI de 4.34, sendo capaz de induzir alguns efeitos enzimáticos como hemólise indireta e inibição da agregação plaquetária e outros efeitos biológicos como edema de pata. Estudos morfológicos do músculo gastrocnemius mostraram que a BP-PLA₂ induziu necrose celular, edema e uma grande concentração de exudato inflamatório.

Estudos futuros tais como o sequenciamento completo da proteína, determinação da estrutura terciária por cristalografia de raio-X, bem como a utilização de outros substratos naturais e artificiais, além de outras metodologias utilizadas na área da biologia molecular serão necessários para se compreender as diferentes ações farmacológicas induzida por esta enzima. Os estudos nessa área resultarão em novas descobertas que possibilitarão a compreensão da toxicidade dessas enzimas tão versáteis podendo utilizá-las como ferramentas em várias áreas do conhecimento científico.

10- Referências Bibliográficas

Andrião-Escarso, S. H., Soares, A. M., Rodrigues, V. M., et al. Myotoxic phospholipase A₂ in *Bothrops* snake venom: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*, *Biochimie* 82 (2000) 755-763.

Carneiro, A. S., Ribeiro, O. G., Franco, M., Cabrera, W. H. K., Vorraro, F., Siqueira, M., Ibañez, O. M., Starobinas, N., Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response, *Toxicon* 40 (2002) 1571-1579.

Chaves, F., Barboza, M., Gutierrez, J. M., Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo) in mice, *Toxicon* 33 (1995) 31-39

Chaves, F., León, G., Alvarado, V. H., Gutierrez, J. M., Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo), *Toxicon* 36 (1998) 1861-1869

Danielle, J. J., Bianco, I. D., Delgado, C., Briones Carrillo, D., Fidelo, G. D., A new phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedi* (yarara chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties, *Toxicon* 35 (1997) 1205-1215.

Danielle, J. J., Bianco, I. D., Fidelo, G. D., Kinetic and pharmacological characterization of phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi* venom, Arch. Bioch. Bioph. 318 (1995)65-70.

Daoud, E., Tu, A . T., Elasmr, M. F., Isolation and characterization of anticoagulant proteinase cerastase F-4, from *Cerastes cerastes* (Egyptian Sand Viper) venom, Thromb. Res. 42 (1986) 52-58.

De Haas, G. H.; Postema, N. M.; Nieuwenhuizen, W., Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas, Biochim Biophys Acta 24 (1968) 103-117.

Díaz-Oreiro, C., Gutiérrez, J. M., Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipase A₂ isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms, Toxicon 35 (1997) 241-252.

Edman, P., Begg, G., A protein sequenator, Europ. J. Biochem 1 (1967) 80-91.

Fuly, A .L., Machado, O . L., 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 78 (1997) 1372-1380.

Fuly, A. L., de Miranda, A. L. P., Zingali, R. B., Guimarães, J. A., Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom, Biochem. Pharmacol. 63 (2002) 1589-1597.

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

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

Gans, C., *Physiology of the Reptilia*, Londres: Academy Press, (1978).

Geoghegan, P., Angulo, Y., Cangelosi, A., Díaz, M., Lomonte, B., Characterization of a basic phospholipase A₂ homologue myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops neuwiedii* (yará chica) from Argentina, *Toxicon* 37 (1999) 1735-1746.

Gutiérrez, J. M., Avila, C., Rojas, E., Cerdas, L., Alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica, *Toxicon* 26 (1988) 411-413.

Gutiérrez, J. M., Chaves, F., Gene, J. A., Lomonte, B., Camacho, Z., Schosinsky, K., Myonecrosis induced in mice by basic myotoxin isolated from the venom of snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica, *Toxicon* 18 (1989) 393.

Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., Chaves, F., Moreno, E., Cerdas, L., Pharmacological activities of a toxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*, Comp. Biochem. Physiol 84C (1986) 159-164.

Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Venom Phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism. (Kini, R. M., Ed.) (1997) 321-352.

Huang, H. C., Release of slow reacting substance from the guinea-pig lung by phospholipase A₂ of *Vipera russelli* snake venom, Toxicon 22 (1984) 359-365.

Itzhaki R. F., Gill D. M., A microbiuret method for estimating proteins, Anal. Biochem. 9 (1964) 401-410.

Iwanaga, S., Suzuki, T., Enzymes in snake venoms, In: Handbook of Experimental Pharmacolog 52 (1979) 158-161.

Kamiguti, A. S., Hay, C. R. M., Theakston, R. D. G., Zuzel, M, Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom of *Bothrops asper*, Arch. Biochem. Biophys 278 (1996) 319-325.

Ketelhut, D. F. J., Homem de Melo, 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* 85 (2003) 983-991.

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

Kini, R., Evans, H. J., A common cytolytic region in myotoxins, hemolysis, cardiotoxins and antibacterial peptides, *Int. J. Peptide Prot. Res.* 34 (1989) 286-277.

Komori, Y., Hagihara, S., Tu, A. T., Specificity of hemorrhagic proteinase from *Crotalus atrox* (Western diamondback rattlesnake) venom, *Biochim. Biophys. Acta* 829 (1985) 127-130.

Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.

Landucci, E. C. T., Castro, R. C., Pereira, M. F., Cintra, A. C. O., Giglio, J. R., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., Antunes, E., de Nucci, G., Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities, *Eur. J. Pharmacol* 343 (1998) 257-263.

Landucci, E. C. T., Castro, R. C., Toyama, M., Giglio, J. R., de Nucci, G., Antunes, E., Inflammatory oedema induced by the Lys-49 phospholipase A₂ homologue piratoxin-I in the rat and rabbit. Effect of polyanions and p-bromophenacyl, *Biochem. Pharmac* 59 (2000)1289-1294.

Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, L. A., Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokines release in a mouse model, *Inflammation* 17 (1993) 93-105.

Markland, F. S., Damus, P. S., Purification and properties of a enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus*, *J. Biol. Chem* 246 (1971) 6460-6465.

Matrisian, L. M., the matrix-degrading metalloproteinases, *BioEssays* 14 (1992) 455-463.

Mebs, D., Myotoxic and neurotoxic phospholipase A₂ In: Hucho F, Ouchinnikov YA editors. *Toxins as tools in neurochemistry*, Berlin: Walter de Gruyter (1983) 337-356.

Mebs, D., Langeluddeke, T., European viper venoms: haemorrhagic and myotoxic activities, *Toxicon* 30 (1992) 1303-1306.

Melo, P. A., Ownby, C. L., Ability of wedelolactone, heparin and para bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA₂ myotoxins, *Toxicon* 37 (1999) 199-215.

Moura-da-Silva, A. M., Desmond, H., Laing, G., Theakston, R. D. G., Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes, *Toxicon* 29 (1991) 713-723.

Nisenbom, H. E., Seki, C., Vidal, J. C., Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. *Toxicon* 24 (1986) 259-272.

Ouyang, C., Huang, T. F., Inhibition of platelet aggregation by 5'-nucleotidase purified from *Trimeresurus gramineus* snake venom. *Toxicon* 21 (1983) 491-501.

Ownby, C. L., Selistre-de-Araújo, H. S., White, S. P., Fletcher, J. E., Lysine 49 phospholipase A₂ proteins, *Toxicon* 37 (1999) 411-445.

Qian, J. I. N., Li-Xia, Y., Hao-Mang, J. I. A. O., Bin, L., Yu-Qun, W. U., Yuan-Cong, Z., Purification, gene cloning and expression of an acidic phospholipase A₂ from *Agkistrodon shedaoensis* Zhao, *Acta Biochim et Biophysica Sinica* 36 (2004) 27-32.

Rodrigues, V. M., Soares, A. M., Mancin, A. C., Fontes, M. R., Homsí-Brnadaburgo, M. I., Giglio, J. R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: Biochemical characterizations and biological activity, *Comp. Biochem. Physiol.* 121(A) (1998) 215-222.

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

Scott, D. L., Achari, A ., Vidal, J. C., Sigler, P. B., Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, *J. Biol. Chem*, 267 (1992) 22645-22657.

Selistre, H. S., Giglio, J. R., Isolation and characterization of the a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa), *Toxicon* 25 (1987) 1135-1144.

Selistre-de-Araújo, H. S., White, S. P., Ownby, C. L., Sequence analysis of Lys-49 phospholipase A₂ myotoxins, *Toxicon* 34 (1996) 1237-1242.

Silva, V. X., Revisão sistemática do complexo (Serepntes, Viperidae, Crotalinae). Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo, (2000) 134p

Soares, A M., Rodrigues, V. M., Homs-Brandeburgo, M. I., Toyama, M. H., Lombardi, F. R., Arni, R. K., Giglio, J. R., A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical, characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity, *Toxicon* 36 (1998) 503-514.

Soares A M., Guerra-Sá R., Borja-Oliveira C. R., Rodrigues V. M., Rodrigues-Simionini L., Fontes M. R. M., Lomonte B., Gutiérrez J. M., Giglio J. R., Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys-49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom, Arch. Biochem. Biophys. 378 (2000) 201-209.

Soares, A. M., Oshima-Franco, Y., Viera, C. A., Leite, G. B., Fletcher, J. E., Jiang, M. S., Cintra, A. C., Giglio, J. R., Rodrigues-Simioni, L., Mn(2+) ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. Int J Biochem Cell Biol 34 (2002) 668-677.

Soares, A. M., Giglio, J. R., Chemical modifications of Phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties, Toxicon 42 (2003) 855-868.

Stocker, K., Barlow, G. H., The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (bathroxobin), In: Methods in Enzymology 45 B (1976) 214 (Lorand, L., Ed) New York, Academic Press.

Tan, N. H., Ponnudurai, G., A comparative study of the biological properties of venoms from snakes of the genus *Vipera* (true adders). Comp Biochem Physiol B 97 (1990) 683-688.

Tetsutaro, S., Yoshimoro, A., Mashahiro, O., Kimihisa, Y., Yasutomi, N., Synergistic action of diacylglycerol and unsaturated fatty acid for protein kinase C activation: its possible implications, *Proc Natl Acad Sci Usa* 88 (1991) 5149-5153.

Verheij, H. M., Volwerk, J. J., Jansen, E. H. J. M., Puyg, W. C., Dijkstra, B. W., Drenth, J., de Haas, G. H., Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂ role of histidina and calcium ion in catalytic mechanism, *Biochem* 19 (1980) 743-750.

Vesteberg, O., Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels, *Biochem. Biophys. Acta* 257 (1972) 11-13.

Vidal, J. C., Stopani, A . O., Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms, *Archs. Biochem. Biophys* 145 (1971) 543-548.

Vishwanath, B. S., Kini, R. M., Gowda, T. V., Characterization of three edema-inducing phospholipase A₂ enzymes from Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid, *Toxicon* 25 (1987) 501-515.

Wang, Y. M., Wang, J. M., Pan, F. M., Tsai, I. M., Lys-49 phospholipase A₂ homologs from venoms of *Deinagkistrodon acutus* and *Trimeresurus mucrosquamatus* have identical protein sequence, *Toxicon* 34 (1996) 485-489.

Yang, C. C., King, K., Chemical modification of histidine residue in basic phospholipase A₂ from the venom of *Naja nigricolis*, *Biochim. Biophys. Acta* 614 (1980) 373.

Zamuner, S. R., Gutierrez, J. M., Muscará, M. N., Teixeira, S. A., Teixeira, C. F. P.,
Bothrops asper and *Bothrops jararaca* snake venom trigger microbicidal functions of
peritoneal leukocytes in vivo, *Toxicon* 39 (2001) 1505-1513.