Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**“Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A₂ ácida
isolada do veneno de *Bothrops pirajai*”**

Sabrina Schaaf Teixeira

Ribeirão Preto – SP
2009

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**“Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A₂ ácida
isolada do veneno de *Bothrops pirajai*”**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Mestre em Toxicologia

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Sabrina Schaaf Teixeira
Orientador: Andreimar Martins Soares

Ribeirão Preto – SP
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Teixeira, Sabrina Schaaf

Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A_2 ácida isolada do veneno de *Bothrops pirajai*. Ribeirão Preto, 2009
95p. :fig

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia
Orientador: Soares, Andreimar Martins

1. Toxinologia 2. *Bothrops pirajai* 3. Fosfolipase A_2

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aprovado em 4 de março de 2009.

Nome do aluno: **Sabrina Schaaf Teixeira**

Título do trabalho: “**Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A₂ ácida isolada do veneno de *Bothrops pirajá*”.**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do título de Mestre em Toxicologia
Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Andreimar Martins Soares

Banca examinadora

Prof. Dra. Hosana Maria Deboni
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni
Instituição: Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

Prof. Dr. Andreimar Martins Soares
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Dedico este trabalho:

A minha família...

Ao meu pai, José Carlos, que tanto admiro.

A minha mãe, Claudete, sempre presente em meu coração. Saudades.

Aos meus irmãos, Milena e Marcos, sempre ao meu lado.

Ao meu querido marido, Felipe e a minha filha, Clara que está chegando.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Andreimar Martins Soares, pela confiança e ensinamentos. Por me fazer voltar a acreditar na pesquisa científica na área da saúde. Um amigo que estará sempre em meu coração.

A Silvana, Clayton, Lucas, Norival, Renata, Danilo, Carolina. Pelo companheirismo e apoio sempre. Pessoas maravilhosas com as quais aprendi e me emocionei. Inesquecíveis. Quantas saudades....

A Prof. Dra. Suely Vilela (FCFRP-USP), por ter cedido espaço no laboratório sob sua responsabilidade, assim colaborando para a realização da parte bioquímica deste trabalho. Aos técnicos do laboratório de Toxicologia da FCFRP, Adélia e João Franco, pelo auxílio técnico-científico fundamental para a realização deste trabalho.

Prof. Dr. Marcos R. M. Fontes (UNESP, Botucatu-SP), pela colaboração nos ensaios de modelagem molecular.

Profa. Dra. Marta C. Monteiro (FMFRP-USP), pela colaboração nos ensaios de atividade microbica e anti-leishmania.

Prof. Dr. Eliane C. Arantes Braga (FCFRP-USP), por ter cedido o espaço do laboratório para a realização do ensaio de focalização isoeletrica.

Prof. Dr. Auro Nomizo (FCFRP-USP) pelo auxílio nos testes de atividade citotóxica sobre células tumorais.

Prof. Dr. Fernando M. Corrêa (FMRP-USP) pela colaboração nos testes de atividade hipotensora.

Prof. Dr. André Fuly, pesquisador da Universidade Federal Fluminense, pelo auxílio na realização dos testes de agregação plaquetária.

A todos os meus amigos, estejam vocês longe ou perto sempre estarão na minha memória e coração.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

Resumo

TEIXEIRA, S.S. **Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A₂ ácida isolada do veneno de *Bothrops pirajai***. 2009. 96fl. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A caracterização proteômica de venenos de serpentes contribui significativamente para o avanço das Ciências na área Biomédica. Várias destas moléculas, utilizadas como instrumentos de investigação de mecanismos celulares e moleculares, estão envolvidas em diversos processos fisiopatológicos e de intoxicação. No entanto, os venenos de serpentes ainda requerem caracterização funcional e/ou biológica adicionais. As fosfolipases A₂s (PLA₂s) são enzimas que induzem vários efeitos farmacológicos, e geralmente, correspondem a maior porcentagem do conteúdo protéico dos venenos de serpentes. Desta forma, o isolamento e a caracterização bioquímica, funcional e estrutural de PLA₂s poderão gerar informações importantes para o melhor entendimento dos efeitos farmacológicos e de intoxicação ocasionados por estas proteínas. Este trabalho descreve o isolamento e a caracterização bioquímica, enzimática, funcional e estrutural da primeira PLA₂ Asp49 ácida, denominada Bpir-I-PLA₂, isolada do veneno da serpente *Bothrops pirajai*, espécie endêmica da região Sul do Estado da Bahia e atualmente, integrante da Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. O isolamento da Bpir-I-PLA₂ foi realizada através de dois passos cromatográficos, envolvendo inicialmente cromatografia de troca iônica, seguida de HPLC de fase reversa. Quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas ácidas, Bpir-I-PLA₂ apresentou alto grau de homogeneidade. A massa molecular relativa, determinada através de eletroforese em gel de poliacrilamida com agente desnaturante, foi de aproximadamente 28.000 para a forma de dímero e 14.500 para o monômero. A focalização isoeletrica demonstrou uma única banda para a fosfolipase A₂, revelando pI aproximado de 4,9. A região N-terminal de Bpir-I-PLA₂, seqüenciada através do método de degradação de Edman, apresentou elevada homologia entre outras PLA₂s de venenos de serpentes. A composição de aminoácidos da proteína corroborou com sua característica ácida, apresentando um elevado conteúdo de aminoácidos carregados

negativamente. A enzima apresentou elevada atividade fosfolipásica e induziu edema moderado *in vivo*. Além disso, Bpir-I-PLA₂ foi capaz de inibir a agregação plaquetária e a coagulação do plasma, e também induzir efeito hipotensor *in vivo* e citotóxico sobre células tumorais, bactérias, fungos e leishmanias. O tratamento da enzima com o reagente brometo de *p*-bromofenacila neutralizou as atividades enzimática, inibitória sobre a agregação plaquetária, anticoagulante, hipotensora e antitumoral. A moderada atividade edematogênica foi parcialmente inibida. O cDNA contendo 366 bp (BPIR-A) que codifica a proteína Bpir-I-PLA₂ foi clonado e a proteína recombinante, expressa. Bpir-I-PLA₂ recombinante apresentou a mesma sequência de aminoácidos, estrutura secundária, atividade fosfolipásica e efeito inibitório sobre plaquetas, observados para a proteína nativa Bpir-I-PLA₂, sugerindo que a recPLA₂ foi eficientemente expressa e purificada. Devido à baixa toxicidade demonstrada, a Bpir-I-PLA₂ pode tornar-se uma ferramenta importante nos estudos das desordens da coagulação, como também um potencial modelo para a elaboração de novos fármacos para uso na clínica-médica.

Palavras-chave: Fosfolipase A₂; *Bothrops pirajai*; caracterização estrutural; caracterização funcional; Bpir-I-PLA₂.

Abstract

TEIXEIRA, S.S. **Functional and structural characterization of acidic phospholipase A₂ isolated from *Bothrops pirajai* snake venom.** 2009. 96fl. Dissertation (Scientific Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The proteomic characterization of snake venoms significantly contributes to science advance in the biomedical area. Several venom toxins are used as instruments for the investigation of cellular and molecular mechanisms, and are involved in a number of physiopathological and intoxication processes. Nevertheless, snake venoms still require further functional and/or biological characterization. Phospholipases A₂ (PLA₂s) are enzymes that induce several pharmacological effects and usually correspond to the major percentage of snake venom protein contents. Being so, the isolation and characterization of PLA₂s could generate important information for the better understanding of the pharmacological and toxic effects caused by these proteins. This work describes the isolation and biochemical, enzymatic and functional characterization of the first acidic Asp49 PLA₂ (named Bpir-I-PLA₂) from the venom of *Bothrops pirajai* snake, an endemic species from the south region of state of Bahia and that nowadays is part of the national list of Brazilian fauna species threatened of extinction. The isolation of Bpir-I-PLA₂ was carried out by two chromatographic steps, an ion-exchange chromatography followed by reverse phase HPLC. When submitted to polyacrylamide gel electrophoresis for acidic proteins, Bpir-I-PLA₂ showed high homogeneity level. The relative molecular mass, determined by polyacrylamide gel electrophoresis with denaturing agent, was of approximately 28,000 for the dimer and 14,500 for the monomer. With high phospholipase activity and pharmacological effects, characteristic of acidic isoforms, Bpir-I-PLA₂ did not present myotoxic activity and showed to be little edematogenic. However, the enzyme acts inhibiting platelet aggregation, delaying plasma clotting time and inducing hypotension, antitumoral effects, antibacteria, antifungal and parasiticide actions. The treatment of the enzyme with the reagent p-bromofenacil brometo neutralized the enzymatic activities, inhibition of aggregation platelet, anticoagulant, hypotensive and antitumoral. The moderate activity edematogenic was inhibited partially. The cDNA (BPIR-A) that codes the protein Bpir-I-PLA₂ was cloned and the protein recombinant, expressed. Bpir-I-PLA₂ recombinant presented the same sequence of amino acids, structures secondary, phospholipase activity and

inhibitory effects on platelet of the native protein, suggesting that recPLA₂ was efficiently express and isolated. Due to its low toxicity, Bpir-I-PLA₂ could become an important tool in the study of the disorders of the clotting as well as a potential model for the elaboration of new drugs for use in the clinic-doctor.

Keywords: Fosfolipase A₂; *Bothrops pirajai*; structural characterization; functional characterization, Bpir-I-PLA₂.

Lista de Figuras

Figura 1. Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil segundo o gênero da espécie causadora do acidente	1
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de catálise proposto para PLA ₂ s.	10
Figura 3. Modelo esquemático da possível interação das PLA ₂ s com a bicamada de fosfolipídio	11
Figura 4. Exemplo de estrutura de PLA ₂	12
Figura 5. Serpente <i>Bothrops pirajai</i>	17
Figura 6. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do cDNA da PLA ₂ por PCR	34
Figura 7. Mapa de restrição do vetor de clonagem pUC99	36
Figura 8. Mapa de restrição do vetor de expressão pET-21a	39
Figura 9. Isolamento da PLA ₂ ácida do veneno de <i>Bothrops pirajai</i>	43
Figura 10. Análise eletroforética para verificação do grau de pureza da fosfolipase A ₂ ácida, Bpir-I-PLA ₂ , isolada do veneno de <i>B. pirajai</i> , e focalização eletroforética ..	44
Figura 11. Análise comparativa da seqüência N-terminal da enzima Bpir-I-PLA ₂ de <i>B. pirajai</i> com outras PLA ₂ s ácidas de venenos de serpentes	46
Figura 12. Atividade fosfolipásica das enzimas Bpir-I-PLA ₂ (na presença e ausência do inibidor BPB) e PrTXIII.	48
Figura 13. Atividade fosfolipásica de Bpir-I-PLA ₂ e do veneno bruto de <i>Bothrops pirajai</i>	50
Figura 14. Caracterização enzimática da Bpir-I-PLA ₂	51
Figura 15. Análise do efeito edematogênico de Bpir-I-PLA ₂ em camundongos	52
Figura 16. Análise do efeito miotóxico de fosfolipases A ₂ isoladas do veneno de <i>B. pirajai</i>	53
Figura 17. Inibição de agregação plaquetária induzida pela Bpir-I-PLA ₂ isolada de <i>Bothrops pirajai</i> na presença de ADP (A) ou colágeno (B).	55
Figura 18. Atividade citotóxica induzida por Bpir-I-PLA ₂ sobre linhagens de células tumorais humanas (JURKAT, SK-BR-3) e murina (EAT).	56
Figure 19. Atividade hipotensora de Bpir-I-PLA ₂ na ausência e presença de BPB ..	57
Figura 20. Atividade microbicida e parasiticida de Bpir-I-PLA ₂ e PrTX-III	58

Figura 21. Sequencia do cDNA e dedução da sequencia de aminoácidos de Bpir-I-PLA ₂ isolada da glândula da serpente <i>Bothrops pirajai</i>	59
Figura 22. Expressão do cDNA de Bpir-I-PLA ₂	60
Figura 23. Múltiplo alinhamento de sequências de Bpir-I-PLA ₂ e outras PLA ₂ s de venenos de serpentes.	61
Figura 24. Modelo estrutural em três dimensões de Bpir-I-PLA ₂ na forma RIBBON	62

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação geral de Fosfolipases A_2	8
Tabela 2. Relação de fosfolipases A_2 isoladas de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> . ..	15
Tabela 3. Fármacos e kits diagnósticos derivados de venenos de serpentes	16
Tabela 4. Análise comparativa da composição em aminoácidos das fosfolipases A_2 ácidas isoladas de <i>B.moojeni</i> , <i>B. jararacussu</i> e <i>B. pirajai</i>	47
Tabela 5. Atividade anticoagulante de Bpir-I-PLA ₂ e PrTX-III.	54

Lista de Abreviaturas

AA – ácido araquidônico
AMBIC – bicarbonato de amônio
Bis-acrilamida - N',N' – metilenobisacrilamida
Bmoo-I-PLA₂ – fosfolipase A₂ ácida isolada do veneno de *Bothrops moojeni*
BPB – brometo de *p*-bromofenacila
Bpir-I-PLA₂ – fosfolipase A₂ ácida isolada do veneno de *Bothrops pirajai*
BSA – albumina de soro bovino
BthA-I-PLA₂ - fosfolipase A₂ ácida isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*
CK – creatina cinase
DMSO – dimetil-sulfóxido
EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético
EGTA – etilenoglicol – bis (N', N', N', N' – ácido tetraacético)
Mr – massa molecular relativa
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS – tampão fosfato em salina
PLA₂ - fosfolipase A₂
PPP – plasma pobre em plaquetas
PRP- plasma rico em plaquetas
PrTX-III –fosfolipase A₂ básica isolada do veneno de *Bothrops pirajai*
RP-HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa
RPMI – meio de cultura do “**Roswell Park Memorial Institute**”, Gibco-BRL
SBF – soro bovino fetal
SD – “*Standard Deviation*” - Desvio padrão
SDS – dodecil sulfato de sódio
TEMED - N',N',N',N' – tetrametiletilenodiamina
TFA – ácido trifluoracético

Sumário

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	viii
1. Introdução	1
1.1. Venenos de serpentes: Aspectos gerais	2
1.2. Veneno botrópico	3
1.3. Fosfolipases A ₂	5
1.4. <i>Bothrops pirajai</i>	17
2. Objetivo	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. Material	20
4. Metodologia	22
4.1. Caracterização Bioquímica	22
4.1.1. Isolamento de Fosfolipase A ₂ ácida do veneno de <i>Bothrops pirajai</i>	22
4.1.2. Determinação quantitativa de proteínas	23
4.1.3. Determinação do Peso Molecular (SDS-PAGE a 12%)	23
4.1.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida em pH alcalino	24
4.1.5. Focalização Isoelétrica:	24
4.1.6. Sequenciamento N-terminal	24
4.1.7. Análise da composição de aminoácidos	26
4.2. Caracterização enzimática e farmacológica	27
4.2.1. Atividade enzimática	27
4.2.2. Atividade anticoagulante	28
4.2.3. Atividade miotóxica	29
4.2.4. Indução de edema em camundongos	30
4.2.5. Efeitos em plaquetas	30
4.2.6. Atividade antitumoral de Bpir-I-PLA ₂	31

4.2.7. Atividade Hipotensora	32
4.2.8. Atividade microbida e na anti-leishmania.....	32
4.2.9. Modificação Química da Fosfolipase A ₂ : Alquilação da His48	33
4.3. Estudo estrutural da fosfolipase A ₂ ácida	33
4.4. Análise estatística dos resultados	42
5. Resultados	43
5.1. Caracterização Bioquímica.....	43
5.1.1. Isolamento da Fosfolipase A ₂ ácida do veneno de <i>Bothrops pirajai</i>	43
5.1.2. Determinação do peso molecular (SDS-PAGE) e ponto isoelétrico	44
5.1.3. Sequenciamento N-terminal e estudo de homologia	45
5.1.4. Análise de aminoácidos.....	47
5.2. Atividades enzimáticas e farmacológicas	48
5.2.1. Atividade fosfolipásica	48
5.2.2. Caracterização enzimática	49
5.2.3. Indução de edema.....	52
5.2.4. Mitoxicidade	53
5.2.5. Atividade anticoagulante	54
5.2.6. Efeito da Bpir-I-PLA ₂ sobre a agregação plaquetária	55
5.2.7. Atividade citotóxica sobre células tumorais	56
5.2.8. Efeito sobre a pressão arterial.....	57
5.2.9. Atividade microbida e parasitcida.....	58
5.3. Estudo estrutural da fosfolipase A ₂ ácida	59
5.3.1. Clonagem e expressão do cDNA de Bpir-I-PLA ₂	59
5.3.2. Modelagem protéica	60
6. Discussão	63
6.1. Isolamento e Caracterização Bioquímica da Fosfolipase A ₂ ácida do veneno de <i>Bothrops pirajai</i>	63
6.2. Atividades enzimáticas, farmacológicas e toxicológicas.....	65
6.3. Caracterização Estrutural da fosfolipase A ₂	74
7. Considerações finais	77
8. Referências	78
9. Anexos	Erro! Indicador não definido.

1. Introdução

O envenenamento causado por serpentes é um problema médico-social relevante. Os valores absolutos de incidência global de envenenamentos e sua severidade permanecem desconhecidos, devido à falta de notificação de inúmeros acidentes, uma vez que as pessoas acometidas não procuram atendimento médico ou habitam regiões onde este não é acessível. A estimativa global de acidentes ofídicos é de 2,5 milhões de casos por ano, contabilizando mais de 100.000 mortes neste mesmo período. Atualmente, a terapia nos casos de envenenamento ocasionado por picadas de serpentes é baseada na administração intravenosa de soro antiofídico que, embora tenha reduzido bastante a mortalidade devido a eficiente capacidade neutralizante de toxinas com ação sistêmica, muitas vezes não atua satisfatoriamente contra os efeitos locais (CHIPPAUX e GOYFFON, 1997; LIZANO et al., 2003; KOH e ARMUGAM, 2006; CALVETE et al., 2007; GUTIÉRREZ et al., 2007).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2005, foram notificados 126.617 acidentes, envolvendo 113 óbitos somente no ano de 2005, o que representa uma média de 25.523 casos/ano para o país. Das notificações, no último ano analisado, que referiram os gêneros das serpentes envolvidas, 87,5% foram ocasionados por serpentes do gênero *Bothrops*. O acidente ofídico acomete, com maior frequência, adultos jovens do sexo masculino durante o trabalho na zona rural (MINISTÉRIO da SAÚDE, 2007).

Figura 1. Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil segundo o gênero da espécie causadora do acidente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A fauna ofídica, no Brasil, de interesse médico está representada, além das serpentes do gênero *Bothrops* (incluindo *Bothriopsis* e *Porthidium*), pelos gêneros *Crotalus*, *Lachesis*, *Micrurus* e por alguns gêneros da Família Colubridae (*Philodryas* e *Clelia*) (CARDOSO et al., 2003).

1.1. Venenos de serpentes: Aspectos gerais

Os venenos de serpentes são fontes de vários componentes bioativos com um amplo espectro de atividades biológicas, com função primordial de digestão e paralisia da presa e que constituem valores potenciais de uso médico e biotecnológico. Estes são formados por uma complexa mistura de substâncias orgânicas que incluem carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, aminoácidos, nucleotídeos, proteínas, peptídeos, e inorgânicas, tais como, cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco. Entretanto, a maior parte das substâncias presentes nos venenos de serpentes é formada por proteínas, que correspondem a cerca de 90 a 95% do peso seco do veneno, muitas das quais apresentam atividade enzimática (BJARNASON e FOX, 1994; CALVETE et al., 2007).

Os componentes dos venenos de serpentes incluem citotoxinas, cardiotoxinas, fatores de crescimento de nervos, lectinas, inibidores e várias enzimas, dentre estas, proteases, fosfolipases A₂s (PLA₂s), metaloproteases, serinoproteases, fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, L-aminoácido oxidases, catalases, ATPases, hialuronidases, NAD nucleosidases e β -glucosaminidases (TU, 1996). Adicionalmente, vários fatores podem interferir na composição dos venenos, atuando nas espécies e nos diferentes gêneros e famílias, tais como: distribuição geográfica, idade do animal, sexo, hábitos alimentares, sazonalidade e caráter individual (CARDOSO et al., 2003).

Sendo a composição química dos venenos de serpentes tão complexa, as lesões produzidas por suas toxinas dependem da natureza desses elementos e da interação biológica de cada um deles, além, é claro, da quantidade de veneno injetada e das condições de saúde da vítima. Por isso, os venenos dos diversos gêneros induzem alterações fisiopatológicas características. Neurotoxinas, por

exemplo, são encontradas geralmente nos venenos das famílias Hydrophiidae e Elapidae, e toxinas hemorrágicas e mionecróticas, nos venenos da família Viperidae.

As pesquisas atuais envolvendo venenos de serpentes consistem na busca do melhor entendimento dos aspectos clínicos do envenenamento humano e dos mecanismos de ação dos venenos e de suas toxinas isoladas, na prospecção de toxinas com potencial terapêutico, no desenvolvimento de novos soros antiofídicos e, adicionalmente, na busca de terapias alternativas ao tratamento convencional.

1.2. Veneno botrópico

O Brasil é um dos países com maior diversidade de espécies de fauna e de flora de todo o Mundo, e possui uma riquíssima fauna de serpentes contando com 361 espécies. Dentre estas, estão as serpentes do gênero *Bothrops*, pertencentes à família Viperidae e à subfamília Crotalinae, contendo espécies com elevada relevância em saúde pública e outras raras, muitas vezes restritas a uma determinada área geográfica (CARDOSO et al., 2003; SBH, 2009).

O gênero *Bothrops* compreende cerca de 23 espécies, amplamente distribuídas pela América Central e do Sul, sendo conhecidas popularmente por jararaca, ouricana, jararacuçu, urutu-cruzeiro, jararaca-do-rabo-branco, malha-de-sapo, patrona, surucucurana, combóia, caïçaca, e outras denominações. Estas serpentes são caracterizadas por possuírem a cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares, aparelho inoculador do tipo solenóglifo, cabeça triangular e fosseta loreal. Habitam principalmente zonas rurais, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas, além de locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de lenha). Possuem hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares e geralmente apresentam comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, desferindo botes sem produzir ruídos (MINISTÉRIO DA SAÚDE-FUNASA, 2001; CARDOSO et al., 2003).

O envenenamento causado por serpentes deste gênero produz marcante dano tecidual local que incluem sintomas como dor, edema, hemorragia e necrose, e adicionalmente distúrbios sistêmicos como coagulopatias, hemorragia sistêmica e falência renal. A necrose muscular é uma séria consequência dos acidentes botrópicos que pode levar a uma perda permanente de tecido e da funcionalidade,

requerendo, muitas vezes, a amputação do membro atingido. O efeito miotóxico se inicia rapidamente sendo mediado principalmente por metaloproteases, devido à conseqüente degeneração e à isquemia, e por ação direta de PLA₂s miotóxicas sobre a membrana plasmática de células musculares (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000; SOARES et al., 2004).

Em geral são descritas três principais atividades fisiopatológicas do veneno botrópico: atividade inflamatória aguda, atividade sobre a coagulação sanguínea e plaquetas e atividade hemorrágica.

Atividade inflamatória aguda: é causada por um conjunto de frações do veneno, bioquimicamente heterogêneas, com especificidades diversas e responsáveis pelos fenômenos locais, como edema, bolhas e necrose. Possivelmente, decorrem da atividade inter-relacionada de proteases, hialuronidases e fosfolipases, da liberação de mediadores da resposta inflamatória, da ação das hemorraginas sobre o endotélio vascular e da ação pró-coagulante do veneno.

Atividade sobre a coagulação sanguínea e plaquetas: a maioria dos venenos botrópicos, de modo isolado ou simultâneo, ativa o fator X e a protrombina. Possui também ação semelhante à trombina, convertendo o fibrinogênio em fibrina. Essas ações produzem distúrbios da coagulação, caracterizados por consumo dos seus fatores, geração de produtos de degradação de fibrina e fibrinogênio, podendo ocasionar incoagulabilidade sanguínea. Este quadro é semelhante ao da coagulação intravascular disseminada. Os venenos botrópicos podem também levar a alterações da função plaquetária bem como plaquetopenia.

Atividade hemorrágica: É atribuída fundamentalmente a componentes específicos denominados hemorraginas, que são metaloproteases dependentes de zinco. São comuns à família Viperidae, como mencionado anteriormente. O mecanismo de ação envolve lesões na membrana basal dos capilares, associadas à plaquetopenia e alterações da coagulação.

Vários estudos vêm investigando as propriedades bioquímicas e farmacológicas de venenos e toxinas de diversas espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, incluindo *Bothrops jararacussu* (BARBOSA et al., 2005), *B. erythromelas* (DE ALBUQUERQUE MODESTO et al., 2006), *B. moojeni* (STÁBELI et al., 2006), *B. leucurus* (HIGUCHI et al., 2007), *B. insularis* (COGO et al., 2006), *B. pirajai* (IZIDORO et al., 2006), *B. pauloensis* (RODRIGUES et al., 2004), dentre muitas outras.

1.3. Fosfolipases A₂

Embora os venenos de serpentes contenham um grande número de proteínas bioativas, as fosfolipases A₂ (PLA₂s) constituem a maioria dos componentes tóxicos (KINI, 2005; SCHALOSKE e DENNIS, 2006).

Fosfolipases A₂ (PLA₂, E.C.3.1.1.4) são enzimas que catalisam a hidrólise dependente de Ca²⁺ da ligação 2-acil éster de 3-*sn*-fosfolipídeos, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídeos. Além do seu papel fundamental no metabolismo de lipídeos, estas enzimas estão intimamente relacionadas com a liberação de ácido araquidônico (AA), um precursor de lipídeos bioativos, tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, que podem participar de uma variedade de funções biológicas, como regulação do sono, resposta imune, inflamação e percepção da dor (ARNI e WARD, 1996; BALSINDE et al., 1999; KINI, 2005; SCHALOSKE e DENNIS, 2006; DE MARIA et al., 2007).

As fosfolipases A₂ estão amplamente distribuídas na natureza e apresentam elevado interesse médico-científico dado seu envolvimento em várias doenças inflamatórias humanas e em envenenamentos por venenos de serpentes e de abelhas. São encontradas em uma variedade de fluídos biológicos e células, como bactérias, plantas, tecidos de mamíferos (pulmão, fígado, baço, coração), eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleares. No entanto, as mais conhecidas e amplamente estudadas são aquelas encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos e nos venenos de répteis e insetos (VAN DEN BOSCH, 1980; VERHEIJ et al., 1981; DENNIS, 1994; NEVALAINEN et al., 2004a, b; SOARES et al., 2004).

As PLA₂s constituem uma superfamília de diferentes enzimas pertencentes a 15 grupos e seus subgrupos (Tabela 1), e incluem cinco tipos distintos de enzimas: as denominadas PLA₂s secretadas (sPLA₂), as citosólicas (cPLA₂), as independentes de Ca²⁺ (iPLA₂), as acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH) e as lisossomais (SCHALOSKE e DENNIS, 2006). O sistema de classificação agrupa estas enzimas considerando a sua origem, seqüência de aminoácidos, mecanismos catalíticos e outras características bioquímicas adicionais.

As sPLA₂s são secretadas com Mr variando entre 13.000 e 18.000, usualmente contendo de 5 a 8 pontes dissulfeto. São enzimas que apresentam uma histidina no sítio ativo e requerem a presença do íon Ca²⁺ para a catálise. As fosfolipases A₂ dos grupos IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII,

XIII, XIV são representantes das sPLA₂s.

As cPLA₂s são grandes proteínas citosólicas com Mr entre 61.000 e 114.000 que utilizam um resíduo de serina catalítico (grupos IVA, IVB, IVC, IVD, IVE, IVF).

As iPLA₂s são enzimas Ca²⁺ independentes que também utilizam uma serina para catálise (grupos VIA-1, VIA-2, VIB, VIC, VID, VIE, VIF).

As PAF-AH são fosfolipases A₂ com serina no sítio catalítico que hidrolisam o grupo acetil da posição *sn*-2 de fatores ativadores de plaquetas (PAF), cujos grupos representantes são VIIA, VIIB, VIIIA, VIIB.

As PLA₂s lisossomais estão reunidas no grupo XV e são enzimas com pH ótimo próximo a 4,5, que possuem resíduos histidina e aspartato conservados sugerindo a presença da tríade catalítica Ser/His/Asp, e também uma suposta sequência sinal N-terminal e sítios de glicosilação N-ligados.

Com o descobrimento de uma grande variedade de fosfolipases A₂ na década passada e a atual expansão de pesquisas na área, mais PLA₂s deverão ainda ser descobertas (SIX e DENNIS, 2000; MURAKAMI e KUDO, 2004; SCHALOSKE e DENNIS, 2006).

Grupo	PLA ₂	Fonte	Massa relativa (Mr)	Características
IA	sPLA ₂	Hydrophiidae e Elapidae	13–15	7 pontes dissu

			(humano/murino)	
IVA	cPLA ₂	Humano/murino	85	Domínio C2
IVB	cPLA ₂	Humano	114	Domínio C2
IVC	cPLA ₂	Humano	61	Acilado
IVD	cPLA ₂	Humano/murino	92–93	Domínio C2
IVE	cPLA ₂	Murino	100	Domínio C2
IVF	cPLA ₂	Murino	96	Domínio C2
V	sPLA ₂	Macrófago/pulmão/coração de humano e murino	14	6 pontes dissulfeto
VIA-1	iPLA ₂	Humano/murino	84–85	8 repetições de sequência consenso
VIA-2	iPLA ₂	Humano/murino	88–90	7 repetições de sequência consenso
VIB	iPLA ₂	Humano/murino	88–91	Ligada a membrana
VIC	iPLA ₂	Humano/murino	146	Proteína integral de membrana
VID	iPLA ₂	Humano	53	Triacilglicerol lipase
VIE	iPLA ₂	Humano	57	Triacilglicerol lipase
VIF	iPLA ₂	Humano	28	Triacilglicerol lipase
VIIA	PAF-AH	Humano,murino,suíno,bovino	45	Secretada,α/β hydrolase
VIIIB	PAF-AH	Humano,bovino	40	Intracelular,PAF α/β hydrolase
VIIIA	PAF-AH	Humano	26	Intracelular, tríade Ser/His/Asp, homodímero ou heterodímero
VIIIB	PAF-AH	Humano	26	Intracelular, tríade Ser/His/Asp, homodímero ou heterodímero
IX	sPLA ₂	Caracol (conodipine-M)	14	6 pontes dissulfeto
X	sPLA ₂	Leucócito/timo/baço humanos	14	8 pontes dissulfeto
XIA	sPLA ₂	Broto verde de arroz (PLA2-I)	12.4	6 pontes dissulfeto
XIB	sPLA ₂	Broto verde de arroz (PLA2-II)	12.9	6 pontes dissulfeto
XII	sPLA ₂	Humano/murino	19	7 pontes dissulfeto
XIII	sPLA ₂	Parvovírus	<10	sem pontes dissulfeto
XIV	sPLA ₂	Fungo simbiótico/bactéria	13–19	2 pontes dissulfeto
XV	PLA ₂ lisossomal	Humano,murino,bovino	45 (deglicosilada)	Tríade Ser/His/Asp, glicosilada,sequência sinal N-terminal

Tabela 1. Classificação geral de Fosfolipases A₂. Em ênfase os grupos representativos de PLA₂s isoladas de venenos de serpentes. *

* Adaptado de SCHALOSKE e DENNIS, 2006.

As PLA₂s de venenos de serpentes (svPLA₂s) são proteínas secretadas pertencentes aos grupos I e II. As do grupo I são encontradas em venenos de serpentes da família Elapidae (Elapinae e Hydrophiinae), enquanto que as do grupo II em venenos de serpentes da família Viperidae (Viperinae e Crotalinae). Usualmente, as do grupo IIA são também subdivididas em dois grandes subgrupos principais: as PLA₂s Asp49, assim denominadas por possuírem um resíduo de aspartato na posição 49, cataliticamente ativas, e as PLA₂s Lys49, nas quais o resíduo de aspartato é substituído por um resíduo de lisina na mesma posição apresentam pouca ou nenhuma atividade, sendo ambas biologicamente ativas. (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; ARNI e WARD, 1996).

As seqüências representantes do sítio catalítico e do sítio de ligação ao cálcio respectivamente, (D₄₂XCCXXHD₄₉) e (X₂₇CGXGG₃₂), são altamente conservadas nas svPLA₂s do grupo II, cataliticamente ativas (MURAKAMI e KUDO, 2002).

O mecanismo catalítico da reação PLA₂-fosfolipídio envolve o ataque nucleofílico de uma molécula de água na ligação *sn*-2 do substrato fosfolipídico (Figura 2). No modelo proposto, o próton na posição 3 do anel imidazólico do resíduo His48 envolvido em uma forte interação com o grupo carboxilato do Asp99, impede que ocorra rotação do anel imidazólico e mantém o nitrogênio da posição 1 deste anel em posição espacial apropriada. Uma molécula de água promove então o ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do substrato, e nesse momento o anel imidazólico da His48 recebe um próton da molécula de água, facilitando a reação. Subseqüentemente à hidrólise da ligação acil-éster na posição *sn*-2 do fosfolipídio, este próton é doado pelo anel imidazólico para o oxigênio que forma então o grupo álcool do lisofosfolipídeo a ser liberado juntamente com o ácido graxo (VERHEIJ et al., 1980; ARNI e WARD, 1996; DE OLIVEIRA et al., 2007).

O íon Ca²⁺, coordenado pelo resíduo Asp49, uma molécula de água e os átomos de oxigênio dos resíduos Gly30, Trp31 e Gly32 (não ilustrados), são responsáveis pela estabilização do intermediário reativo (ARNI e WARD, 1996).

A atividade catalítica sobre membranas sugere um importante papel das fosfolipases de venenos de serpentes (svPLA₂s) na sua toxicidade. O desarranjo dos componentes fosfolipídicos ocasiona severas alterações na integridade estrutural e funcional das membranas plasmáticas com conseqüente influxo de íons cálcio (GUTIÉRREZ et al., 1989) acarretando a liberação de proteases dependentes de cálcio (DUNCAN, 1978), a ativação de PLA₂s endógenas (TRUMP et al., 1981) e o

colapso mitocondrial (GOPALAKRISHNAKONE et al., 1984). A somatória de todas essas alterações moleculares poderia resultar em morte celular.

Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de catálise proposto para PLA₂s. Interação dos resíduos do sítio catalítico de sPLA₂s e o íon cálcio com o estado de transição da reação catalítica no qual uma molécula de água polarizada pelos resíduos H48 e D99 se liga ao grupo carbonila do substrato (VERHEIJ et al., 1980).

Assim sendo, a substituição do resíduo Asp49 por Lys49 afeta drasticamente a ligação do cálcio às PLA₂s, justificando sua baixa ou inexistente atividade catalítica. Apesar de inativas cataliticamente, as PLA₂s Lys49 demonstram atividade lítica sobre membranas através de um mecanismo independente de cálcio. Estudos com peptídeos sintéticos, mapeando sítios de interação com moléculas neutralizantes, e mutagênese sítio dirigida tem demonstrado que uma região molecular contendo aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos presentes na região C-terminal das PLA₂s Lys49 é essencial para suas atividades miotóxica, bactericida e sobre lipossomos (LOMONTE et al., 2003; CHIOATO e WARD, 2003; AMBROSIO et al., 2005).

A atividade de svPLA₂s é determinada pelas propriedades físicas da membrana celular e pela constituição e distribuição lipídicas. Recentes estudos

procuram elucidar o mecanismo de ação de svPLA₂s sobre seus substratos através da interação da enzima com a membrana celular. De acordo com o modelo proposto (Figura 3), as svPLA₂s se mantêm cataliticamente inativas em meio aquoso devido à baixa afinidade das PLA₂s Asp49 ao íon cálcio em água. Quando a enzima penetra parcialmente na região hidrofóbica da bicamada lipídica, várias mudanças conformacionais ocorrem tornando o sítio ativo mais acessível ao seu cofator e também ao seu substrato. A hidrólise procede, e seus produtos parecem aumentar a afinidade da enzima à membrana (DE OLIVEIRA et al., 2007; WACKLIN et al., 2007).

Figura 3. Modelo esquemático da possível interação das PLA₂s com a bicamada de fosfolipídio. A enzima (estrutura em amarelo) se encontra na interface lipídio-água e parcialmente penetra na bicamada. As moléculas de ácido graxo (grupo cabeça azul) se acumulam na bicamada enquanto os lisofosfolipídios (grupos cabeça rosa) interagem com a solução (WACKLIN et al., 2007).

As svPLA₂s estão entre as menores enzimas contendo aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos quando em cadeia única. Estas proteínas são muito estáveis devido à presença de muitas pontes dissulfeto, e exibem significantes similaridades em sua estrutura tridimensional, embora demonstrem diferentes propriedades farmacológicas, o que torna intrigantes o mecanismo de ação e a sua relação estrutura-função, fazendo destas enzimas alvos de inúmeras pesquisas.

Devido a sua relativa abundância em várias fontes naturais, à fácil purificação e alta estabilidade, as PLA₂s estão entre as enzimas melhor estudadas e muitas delas possuem sua estrutura terciária determinada, por exemplo, a piratoxina-III isolada do veneno de *Bothrops pirajai* (RIGDEN et al., 2002), a miotoxina-I de

Bothrops moojeni (MARCHI-SALVADOR et al., 2005) e a BthA-I-PLA₂ de *Bothrops jararacassu* (MAGRO et al., 2005).

A estrutura terciária conservada das svPLA₂s (Figura 4) é constituída por duas α -hélices antiparalelas (hélice 2 e 3) com características anfipáticas, nas quais os resíduos hidrofílicos estão expostos ao solvente e os resíduos hidrofóbicos dispostos no interior. Os resíduos polares do sítio catalítico (His48, Asp49, Asp99 e Tyr52) estão situados no interior destas duas α -hélices, representando então a exceção para a distribuição descrita anteriormente. As PLA₂s são também constituídas por uma região N-terminal, representada por uma α -hélice 1 (resíduos 1 a 12). Em seguida está localizada uma curta hélice (*short helix*) formada pelos resíduos 18-23. Entre os resíduos 25-34 está o *loop* ligante de cálcio, seguido pela α -hélice 2 (resíduos 40 a 55) à qual se liga a folha β curva antiparalela (β -wing) (resíduos 75 a 77 e 82 a 84). Após a região β -wing, está a α -hélice 3 (resíduos 90 a 107) que se liga a uma região bastante flexível, denominada *loop* C-terminal (resíduos 108 a 113). A presença de 7 pontes dissulfeto nas posições entre Cys51-Cys133 e a extensão C-terminal de 5-7 aminoácidos é característica das PLA₂s do grupo II (RENETSEDER et al., 1985; ARNI e WARD, 1996).

Figura 4. Exemplo de estrutura de PLA₂. Representação em fita da estrutura terciária da PLA₂ SIIISPIIB de *Bothrops jararacassu*. O íon cálcio representado como uma grande esfera preta e as pontes dissulfeto, delineadas como linhas finas. (Adaptado de KETELHUT et al., 2003).

Uma grande variedade de metodologias vem sendo utilizada com o objetivo de elucidar a relação estrutura-função das diversas isoformas de PLA₂s, desde a tradicional modificação química de aminoácidos específicos e o conseqüente efeito nas atividades enzimáticas e farmacológicas, considerada a principal estratégia de estudo na tentativa de elucidar o mecanismo de ação destas proteínas multifuncionais, e até mutagênese sítio dirigida, técnicas espectrofotométricas, cristalográficas e ressonância magnética nuclear, além de estudos de ligação com inibidores e substratos naturais e artificiais (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; ARNI e WARD, 1996; VALENTIN e LAMBEAU, 2000; SOARES e GIGLIO, 2003; SOARES et al., 2004; KINI, 2005; SCHALOSKE e DENNIS, 2006; MARCUSSI, et al., 2007).

A alquilação do resíduo de His48, altamente conservado, utilizando brometo de *p*-bromofenacila (BPB), induz a perda de atividade enzimática e redução dos efeitos tóxicos e farmacológicos das fosfolipases A₂ (SOARES e GIGLIO, 2003). Muitos estudos envolvendo modificação química de svPLA₂s usando BPB já foram realizados em vários venenos de serpentes (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; SOARES et al., 2001; MAGRO et al., 2005).

Até o momento, centenas de svPLA₂s já foram purificadas e caracterizadas. Tais enzimas apresentam similaridades funcionais e estruturais com PLA₂s de mamíferos. Porém muitas são tóxicas e exibem uma variedade de efeitos farmacológicos através de mecanismos que podem ser dependentes e/ou independentes de sua atividade enzimática, dentre eles, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, miotoxicidade, hemólise, convulsão, anticoagulação, efeito sobre plaquetas, indução de edema e danos em tecidos (SOARES e GIGLIO, 2003; KINI, 2003; 2005; SCHALOSKE e DENNIS, 2006).

A existência em um mesmo veneno de serpente de múltiplas isoformas de PLA₂s associadas a um grande número de atividades farmacológicas está relacionada a um processo acelerado de evolução no qual altas taxas de mutações em regiões codificantes de genes, principalmente associadas com as partes expostas de moléculas, tem permitido o desenvolvimento de novas funções (KINI e CHAN, 1999; ZULIANI et al., 2005).

Em um modelo de ação, proposto por Kini e Evans (1989), as PLA₂s de venenos de serpentes exibem uma variedade de efeitos farmacológicos por interação específica a "sítios alvo" presentes na superfície de células ou tecidos. Tais efeitos podem ser dependentes e/ou independentes da atividade enzimática.

Nos mecanismos dependentes da atividade enzimática, a hidrólise de fosfolipídios ou a liberação dos produtos desta hidrólise podem causar os efeitos farmacológicos, pois os danos às membranas podem afetar as proteínas a elas ancoradas. Já nos mecanismos independentes a interação, como agonista ou antagonista, com as proteínas alvo é responsável pelos efeitos farmacológicos (KINI, 1997; 2003; 2005).

Diversas PLA₂s isoladas de venenos de serpentes possuem atividade sobre o sistema hemostático (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; ROBERTO et al., 2004; DE ALBUQUERQUE MODESTO et al., 2006). Atualmente, as svPLA₂s com efeitos sobre plaquetas podem ser divididas em três grupos: classe A que inclui as fosfolipases que induzem agregação plaquetária; classe B, fosfolipases que inibem a agregação plaquetária; classe C, fosfolipases que induzem uma resposta bifásica (pro- e anti-agregante) (KINI e EVANS, 1990).

A maioria das PLA₂s isoladas do veneno de *Bothrops*, descritas até então, são proteínas básicas com pI variando entre 7 a 10 (Tabela 2). As PLA₂s ácidas, isoladas do mesmo gênero, ainda estão sendo exploradas, e em geral, não apresentam toxicidade experimental, mas induzem importantes efeitos farmacológicos como inibição da agregação plaquetária e hipotensão arterial (SERRANO et al., 1999; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; ROBERTO et al., 2004; DE ALBUQUERQUE MODESTO et al., 2006). Entretanto, algumas PLA₂s ácidas isoladas são consideradas tóxicas, dentre elas: uma de *Bothrops alternatus*, reportada por induzir hemorragia pulmonar e necrose em células do músculo cardíaco de murinos (NISENBOM et al., 1986); duas isoformas de *B. insularis*, denominadas BinTXs, que induzem edema, neurotoxicidade e miotoxicidade (COGO et al., 2006) e outras duas recentemente isoladas de *B. pauloensis* e *B. moojeni*, que induzem mionecrose (RODRIGUES et al., 2007; SANTOS-FILHO et al., 2008). Fuly e colaboradores (1997; 2000) demonstraram que as PLA₂s ácidas do veneno de *Lachesis muta* também são capazes de induzir mionecrose e inibir a agregação plaquetária. Estas enzimas de caráter ácido ainda merecem maiores estudos na tentativa de elucidar os seus mecanismos de ação enzimático e tóxico, e suas possíveis aplicações farmacológicas.

O isolamento e a caracterização proteômica de venenos de serpentes tornam-se necessários, pois originam potenciais benefícios para a pesquisa básica, diagnóstico clínico, e desenvolvimento de novas ferramentas de pesquisas e drogas de potencial uso clínico (ROBERTO et al., 2004; CALVETE et al., 2007).

Tabela 2. Relação de fosfolipases A₂ isoladas de serpentes do gênero *Bothrops*.

PLA ₂ s ácidas	<i>Bothrops</i>	pI	Mr	PLA ₂	Miotóxica	Anticoagulante	Plaquetas	Ref.
Basp-PLA ₂	<i>asper</i>	ácida	14.500	+	-	nd	-	*
PLA ₂	<i>alternatus</i>	5,0	15.000	+	+	nd	nd	1
BE-I-PLA ₂	<i>erythromelas</i>	4,67	13.649	+	nd	nd	-	3
BinTX-I	<i>insularis</i>	5,05	13.975	+	+	nd	nd	4
BinTX-II	<i>insularis</i>	4,49	13.788	+	nd	nd	nd	4
PLA ₂	<i>jararaca</i>	4,5	14.303	+	-	nd	nd	5
BthA-I-PLA ₂	<i>jararacussu</i>	4,5	13.700	+	-	nd	-	6
SIISPIIA	<i>jararacussu</i>	5,3	15.000	+	Leve	+	Sem ativ	7
SIISPIIB	<i>jararacussu</i>	5,3	15.000	+	Leve	+	-	7
SIISPIIIA	<i>jararacussu</i>	5,3	15.000	+	Leve	+	Sem ativ	7
SIISPIIIB	<i>jararacussu</i>	5,3	15.000	+	Leve	+	Sem ativ	7
PLA ₂	<i>lanceolatus</i>	4,9	14.500	+	nd	nd	nd	8
Bmoo-I-PLA ₂	<i>moojeni</i>	5,2	14.000	+	-	+	-	*
P1	<i>neuwiedi</i>	4,8	15.000	+	-	+	Sem ativ	9
P2	<i>neuwiedi</i>	4,6	16.200	+	-	+	Sem ativ	9
P3	<i>neuwiedi</i>	ácida	15.000	+	nd	nd	nd	10
Bp-PLA ₂	<i>pauloensis</i>	4,3	15.800	+	+	nd	-	11
Bpir-I-PLA ₂	<i>pirajai</i>	4,9	14.500	+	-	+	-	12
BmooTX-I	<i>moojeni</i>	ácida	15.000	+	+	nd	-	*
PLA ₂ s	<i>Bothrops</i>	pI	Mr	PLA ₂	Miotóxica	Anticoagulante	Plaquetas	Ref.
Mtx-I	<i>brazili</i>	8,0	13.870	+	+	+	nd	2
Mtx-II	<i>brazili</i>	8,2	13.975	-	+	nd	nd	2
Miotoxina-I	<i>asper</i>	8,7	13.981	+	+	+	nd	13
Miotoxina-II	<i>asper</i>	9,1	13.739	-	+	Sem ativ	nd	14
Miotoxina-III	<i>asper</i>	9,1	13.789	+	+	nd	nd	15
Miotoxina-IV	<i>asper</i>	9,1	13.886	-	+	+	nd	16
BaTX-PLA ₂	<i>alternatus</i>	8,63	13.898	-	+	nd	nd	17
BaPLA ₂ -I	<i>atrox</i>	9,1	15.000	+	+	nd	nd	18
BaPLA ₂ -III	<i>atrox</i>	6,9	15.000	+	+	nd	nd	18
Miotoxina-I	<i>atrox</i>	8,9	13.826	-	+	Sem ativ	nd	19
godMT-I	<i>godmani</i>	8,2	14.300	+	+	+	nd	20
godMT-II	<i>godmani</i>	8,6	13.713	-	+	+	Nd	20
BthTX-I	<i>jararacussu</i>	8,2	13.800	-	+	nd	nd	21
BthTX-II	<i>jararacussu</i>	7,7	15.700	+	+	nd	nd	21
Bj-IV	<i>jararacussu</i>	7,83	15.000	+	nd	nd	nd	22
Bj-V	<i>jararacussu</i>	7,99	14.039	+	nd	nd	nd	22
blK-PLA ₂	<i>leucurus</i>	básica	14.000	+	nd	nd	nd	23
blD-PLA ₂	<i>leucurus</i>	básica	14.000	+	nd	Sem ativ	Sem ativ	23
MjTX-I	<i>moojeni</i>	8,9	13.737	-	+	Sem ativ	nd	24
MjTX-II	<i>moojeni</i>	8,9	13.887	-	+	Sem ativ	nd	25
BnSP-6	<i>neuwiedi</i>	8,2	13.500	-	+	nd	nd	26
BnSP-7	<i>neuwiedi</i>	8,9	13.726	-	+	nd	nd	26
Miotoxina-I	<i>nummifer</i>	básica	16.000	-	+	Sem ativ	nd	27
Miotoxina-II	<i>nummifer</i>	básica	16.000	-	+	Sem ativ	nd	28
BnpTX-I	<i>pauloensis</i>	7,8	14.000	+	+	+	nd	29
BnpTX-II	<i>pauloensis</i>	7,8	14.000	+	+	+	nd	29
PrTX-I	<i>pirajai</i>	8,9	13.729	-	+	nd	nd	30
PrTX-II	<i>pirajai</i>	9,0	13.744	-	+	nd	nd	31
PrTX-III	<i>pirajai</i>	8,5	13.867	+	+	+	nd	32
Miotoxina-I	<i>schelegelli</i>	9,3	16.000	-	+	+	nd	33

Legenda: (+) com atividade; (-) sem atividade (exceção coluna plaquetas é inibitória); (nd) não determinado. Referências: (*) Não publicado; 1- NISENBON et al., 1986; 2- COSTA et al., 2008; 3- DE ALBUQUERQUE MODESTO et al., 2006; 4- COGO et al., 2006; 5- MACHADO et al., 1993; 6- ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; 7- KETELHUT et al., 2003; 8- LOBO DE ARAÚJO et al., 1994; 9- DANIELE et al., 1995; 10- DANIELE et al., 1997; 11- RODRIGUES et al., 2007; 12 - Presente trabalho; 13- GUTIÉRREZ et al., 1984; 14- LOMONTE e GUTIÉRREZ, 1989; 15- KAISER et al., 1990; 16- DÍAZ et al., 1995; 17- PONCE-SOTO et al., 2007; 18- KANASHIRO et al., 2002; 19- NÚÑEZ et al., 2004; 20- DÍAZ et al., 1992; 21- HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; 22- PONCE-SOTO et al., 2006; 23- HIGUCHI et al., 2007; 24- SOARES et al., 2000b; 25- SOARES et al., 1998; 26- RODRIGUES et al., 1998; 27- GUTIÉRREZ et al., 1986; 28- ANGULO et al., 2000; 29- RODRIGUES et al., 2004; 30- MANCUSO et al., 1995; 31- TOYAMA et al., 1995; 32- TOYAMA et al., 1999; 33- ANGULO et al., 1997

Os venenos de serpentes contêm um grande número de componentes com grande potencial como agentes terapêuticos em doenças humanas. Diversos fármacos derivados de venenos de serpentes têm sido utilizados na clínica médica (Tabela 3). A primeira droga isolada de veneno de serpente foi descoberta em 1975. O captopril, derivado de um peptídeo isolado do veneno da serpente brasileira *Bothrops jararaca* é utilizado como anti-hipertensivo por sua ação inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina (KOH et al., 2006). Desde então, novas aplicações farmacêuticas são identificadas em outros componentes dos venenos, desde o potencial antitumoral de desintegrinas até a utilização de proteínas como reagentes de kit de diagnósticos.

Tabela 3. Fármacos e kits diagnósticos derivados de venenos de serpentes *

Fármaco/nome comercial	Fonte	Indicação	Mecanismo de ação
Captopril®	<i>Bothrops jararaca</i>	Tratamento de hipertensão	Inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA)
Integrilina®	<i>Sistrurus mliarius barbouri</i>	Uso em angioplastia coronária	Antagonista do receptor da glicoproteína (GP) IIb/IIIa humana plaquetária; inibição da agregação plaquetária
Aggrastat®	<i>Echis carinatus</i>	Tratamento de angina	Antagonista reversível do receptor da glicoproteína plaquetária (GP) IIb/IIIa; inibição da agregação plaquetária
Ancrod®	<i>Agkistrodon rhodostoma</i>	Choque	Inibição do fibrinogênio
Defibrase®	<i>Bothrops moojeni</i>	Infarto cerebral agudo, angina peitoral	Inibição da trombina e protrombina
Hemocoagulase®	<i>Bothrops atrox</i>	Prevenção e tratamento de hemorragia	Efeito tipo trombina e atividade trombolítica
Protac®	<i>Agkistrodon contortix contortix</i>	Diagnóstico clínico de desordem hemostática	Ativação da proteína C
Reptilase®	<i>Bothrops jararaca</i>	Diagnóstico de desordens de coagulação sanguínea	_____
Ecarin®	<i>E. carinatus</i>	Diagnóstico	Ativação de protrombina
Exanta®	Cobra	Coagulopatias	Inibidor de trombina, anticoagulante

*(Adaptado de KOH et al., 2006; FOX e SERRANO, 2008).

1.4. *Bothrops pirajai*

De um modo geral, pouco é conhecido a respeito do veneno da serpente *Bothrops pirajai* (Figura 5), inicialmente descrita por Amaral (1926), espécie endêmica da região Sul do Estado da Bahia, no nordeste do Brasil, sendo popularmente denominada “jararacuçu da Bahia” (TOYAMA et al., 1995; COSTA et al., 1999).

Atualmente, a espécie se encontra na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção na categoria *em perigo* (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2008). O ambiente florestal da *Bothrops pirajai* é muito restrito e está sendo destruído. A conservação da biodiversidade brasileira é imprescindível tanto do ponto de vista ecológico, levando em conta a manutenção da integridade do meio ambiente, como também do ponto de vista químico/farmacológico, considerando a perda de substâncias terapêuticas valiosas ainda desconhecidas.

Figura 5. Serpente *Bothrops pirajai* (Fonte: <http://www.diagnostico.org.br>).

Mancuso et al. (1995) iniciaram os estudos envolvendo o isolamento de uma miotoxina do veneno de *Bothrops pirajai*, denominada piratoxina-I (PrTX-I). Até o momento, foram isoladas, do mesmo veneno, três fosfolipases A₂ miotóxicas denominadas piratoxinas (PrTX)-I, -II e -III as quais foram caracterizadas estrutural e funcionalmente (MANCUSO, et al., 1995; DE AZEVEDO et al., 1998; LEE, et al., 1999; TOYAMA et al., 1995, 1998, 1999; 2000; LANDUCCI et al., 2000; SOARES et al., 2001; RIGDEN et al., 2003). As PrTX-I (Mr. 13.729 e pI 8,9) e PrTX-II (Mr. 13.744 e pI 9,0), contém 121 resíduos de aminoácidos. Estas enzimas são PLA₂s Lys49 cataliticamente inativas sobre substratos artificiais e promovem bloqueio da transmissão neuromuscular, enquanto que a PrTX-III (Mr. 13.867 e pI 8,5), contém 120 resíduos de aminoácidos e é uma PLA₂ Asp49 com moderada atividade catalítica, atividade miotóxica e anti-coagulante. Além disso, todas as piratoxinas apresentam atividade bactericida, induzem edema e lisam lipossomos (SOARES et al., 2001).

Em 1999, Costa e colaboradores demonstraram que o veneno de *Bothrops pirajai* possui um efeito miotóxico e neurotóxico, capaz de bloquear a resposta contrátil na preparação do músculo extensor “digitorum longus” (EDL) de camundongo. Também deste mesmo veneno foram isoladas uma lectina tipo-C denominada BPL (HAVT et al., 2005) e uma L-aminoácido oxidase (BpirLAAO-1) com atividade antiparasitária, antibacteriana e antitumoral (IZIDORO et al., 2006).

Desta forma, até o presente momento, nenhum estudo abordou a caracterização funcional e estrutural de uma PLA₂ ácida do veneno de *Bothrops pirajai* o que nos motivou a desenvolver o atual projeto.

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A_2 ácida isolada do veneno de *Bothrops pirajai*.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- a) Isolamento da PLA_2 ácida em duas etapas cromatográficas (CM-Sephareose e fase reversa em Sistema HPLC).
- b) Caracterização Bioquímica: determinação do peso molecular, ponto isoelétrico, seqüência N-terminal.
- c) Caracterização Enzimática: atividade fosfolipásica. Modificação Química de His48 com BPB e efeito de íons metálicos divalentes para se estudar o mecanismo de ação dependente ou não da atividade enzimática.
- d) Caracterização Funcional: letalidade, atividade anticoagulante, antitumoral, miotóxica, indução de edema, ação sobre a pressão arterial, atividades bactericida e anti-leishmania.
- e) Caracterização Estrutural: clonagem e seqüenciamento de cDNA, análise da estrutura primária (Clustal e Phylip). Estudos de modelagem molecular.

3. Material

3.1. Veneno: Cerca de 1g do veneno de *Bothrops pirajai* foram adquiridos do Serpentário Proteínas Bioativas Ltda, Batatais-SP.

3.2. Animais: Foram utilizados para os ensaios biológicos e farmacológicos, camundongos machos da linhagem *Swiss* (25 a 30g) e ratos *Wistar* (180 a 220g) fornecidos pelo biotério central da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto-SP. O projeto está de acordo com o regimento e as normas éticas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA; certificado número 07.1.516.53.6) e com as regras do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA número 11781-1) (Anexos).

3.3. Reagentes e Equipamentos

- Bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3 , AMBIC), (Vetec)
- Carboximetil-Sepharose (CM-Sepharose), (2,0 x 20cm), (Pharmacia Biotech)
- Ácido trifluoracético (TFA), (Merck)
- Acetonitrila (Merck)
- Metanol (Synth)
- Centrifuga Excelsa II (FANEM)
- Espectrofotômetro (GENESYS)
- Coletor automático (Pharmacia Biotech – RediFrac)
- Bomba peristáltica (Pharmacia Biotech)
- HPLC (Shimadzu), coluna C-18 (2,0 x 250 mm)
- AMICON Modelo 8050 (MILLIPORE)
- Membrana de ultracentrifugação (MILLIPORE)
- Sulfato de cobre hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), (Acrós Organics)
- Hidróxido de sódio (NaOH), (Synth)
- Acrilamida e Bis-acrilamida (N',N' -metilenobisacrilamida), (Sigma Chem. Co)
- $\text{N}',\text{N}',\text{N}',\text{N}'$ – tetrametiletenodiamino (TEMED), (Sigma Chem. Co)
- Dodecil sulfato de sódio (SDS), (Pharmacia Biotech)
- *Coomassie Brilliant Blue* G-250 (Sigma Chem. Co)
- Azul de bromofenol (Merck)

- β -mercaptoetanol (Pharmacia Biotech)
- Persulfato de amônio (Pharmacia Biotech)
- Tris-base (Sigma Chem. Co)
- Padrões de peso molecular para proteínas de Mr 14.000-70.000 (Sigma)
- Glicina (Sigma Chem. Co)
- Tris (Invitrogen)
- Ácido clorídrico (HCl), (Synth)
- Ácido acético (C₂H₄O₂), (Synth)
- Sacarose (Synth)
- Aparelho: *Electrophoresis Power Supply* EPS 601, (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)
- Buffalyte (Pierce)
- Papel Whatman número 3
- Papel da LKB de 1,0 x 0,5 cm
- Ácido fosfórico (H₃PO₄), (Synth)
- Banho (CIENTEC)
- Azida sódica (Sigma Chem. Co)
- Soroalbumina bovina (BSA), (Sigma Chem. Co)
- Triton-X100 (Pharmacia Biotech)
- Peroxidase de rábano Tipo IV (Sigma Chem. Co)
- Kit CK-NAC cinético (BioClin)
- Soro fetal bovino (SFB), (Sigma Chem. Co)
- Fosfatidilcolina (Sigma Chem. Co)
- Diacetilfosfato (Sigma Chem. Co)
- Brometo de p- bromofenacila (BPB), (Sigma Chem. Co)
- EDTA (Sigma Chem. Co)
- EGTA (Sigma Chem. Co)
- Heparina (Sigma Chem. Co)
- Paquímetro de baixa pressão 0,01mm, (Mitutoyo, Japão)

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e provenientes da Sigma, Pharmacia e Merck.

4. Metodologia

4.1. Caracterização Bioquímica

4.1.1. Isolamento de Fosfolipase A₂ ácida do veneno de *Bothrops pirajai*

Preparação da amostra: Cerca de 200mg do veneno bruto cristalizado de *B. pirajai* foram suspensos em 1,5mL de tampão bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) 0,05M, pH 8,1 e centrifugados a 1.530xg, durante 10 minutos a 4°C, em centrífuga Excelsa Baby I. Alíquotas do sobrenadante foram retiradas para dosagem de proteínas e monitoramento em espectrofotômetro (Genesys 10UV) a 280nm, e o restante foi submetido ao primeiro passo cromatográfico.

Etapas cromatográficas: A cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose foi realizada conforme descrito por SOARES et al. (1998). A amostra de veneno foi aplicada em uma coluna contendo resina CM-Sepharose (2,0x 20cm), equilibrada em tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 8,1, e eluída em mesmo tampão com gradiente de concentração até 1M. Para tanto, foi utilizado um fluxo de 0,5mL/min, coletando-se frações de 3,5mL/tubo.

Os picos obtidos foram analisados em SDS-PAGE e quanto à atividade enzimática, sendo selecionada a fração de interesse. A fração ácida, denominada P-IB (10mg), contendo a proteína de interesse, foi liofilizada, dissolvida em 150μL de solução contendo 5% (v/v) acetonitrila e 1% (v/v) ácido trifluoracético (TFA), homogeneizada e centrifugada a 480xg por 2 minutos, sendo posteriormente submetida a um sistema de HPLC em coluna de fase reversa utilizando coluna C-18 (2,0 x 250 mm) (Shimadzu).

A coluna foi equilibrada nos solventes de corrida (solvente A - acetonitrila 5%, TFA 1%; solvente B - acetonitrila 60%, TFA 0,1%) e a eluição seguiu com gradiente de concentração de 30-100% de solvente B, com um fluxo de 1mL/min durante 70 min. Todos os passos de purificação foram realizados em temperatura ambiente (25°C) e os picos obtidos foram monitorados por espectrofotômetro em 280nm e através da atividade enzimática. O grau de pureza da PLA₂ ácida isolada foi avaliado por RP-HPLC, SDS-PAGE e gel para proteínas ácidas e as amostras desta enzima foram liofilizadas e utilizadas para caracterização farmacológica e bioquímica.

Sistema de ultrafiltração: As frações eluídas das cromatografias foram submetidas a um sistema de ultrafiltração AMICON, utilizando membrana de separação para PM < 10.000. As frações foram monitoradas em espectrofotômetro a 280nm, sendo concentradas, liofilizadas e armazenadas a 4°C.

4.1.2. Determinação quantitativa de proteínas: As dosagens de proteínas em soluções contendo 0,05 a 2,0mg/mL foram realizadas pelo método do microbiureto, conforme descrito por Itzhaki e Gill (1964). A reta padrão foi construída utilizando soroalbumina bovina como proteína padrão.

4.1.3. Determinação do Peso Molecular (SDS-PAGE a 12%): Foi realizada segundo metodologia descrita por Laemmli (1970), com modificações conforme descrito a seguir. O gel de separação de acrilamida a 12% (m/v) (bis-acrilamida: acrilamida 1:19 m/m) foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 8,8 e SDS 1%. O gel de empacotamento de acrilamida a 6% foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 0,1%. Amostras de proteína ou veneno bruto foram dissolvidas em tampão fosfato em salina (PBS), acrescidas de 4µL de tampão para amostras (Tris-HCl 0,5M, pH 6,5 contendo azul de bromofenol (0,01%) e SDS (2%)) e submetidas à fervura a 100°C por 4 minutos. As amostras da proteína foram preparadas na presença ou ausência de β-mercaptoetanol (agente redutor) que foi adicionado ao tampão de amostra a 3,5%.

Após a corrida eletroforética, em tampão Tris-Glicina, realizada a 95V e 15mA (*Electrophoresis Power Supply* EPS 301 – AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH), o gel foi corado por 10 minutos com *Coomassie brilliant blue* (G-250) 0,2% (p/v) dissolvido em água: metanol: ácido acético (40: 50: 10, v/v) e descorado em ácido acético 10%. Em seguida, o gel foi documentado em *scanner*, e embebido em gelatina incolor a 5% para secagem entre papéis celofane.

O padrão de peso molecular utilizado (Sigma) é composto pelas seguintes proteínas: albumina bovina (66.000 Da), ovoalbumina (45.000 Da), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho (36.000 Da), anidrase carbônica bovina (29.000 Da), tripsinogênio de pâncreas bovino (24.000 Da), inibidor de tripsina de soja (20.100 Da) e α-lactalbumina de leite bovino (14.200 Da). A mobilidade eletroforética relativa de cada banda foi determinada em centímetros e o peso

molecular foi calculado, relacionando-se a mobilidade eletroforética relativa com o logaritmo do peso molecular do padrão.

4.1.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida em pH alcalino: A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida a 10% (m/v), segundo método descrito por Davis (1964) para migração de proteínas ácidas. O tampão do eletrodo foi Tris-Glicina pH 8,3. As amostras foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,025M, pH 6,8, contendo sacarose a 10% (m/v). Como indicador de migração, foi adicionado a um poço do gel 10µL de tampão contendo azul de bromofenol a 0,1%. As condições eletroforéticas foram: 120V com corrente de 10mA (*Electrophoresis Power Supply* EPS 601 – AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). O gel foi corado com azul de Comassie G-250 0,1% (p/v) dissolvido em água: metanol: ácido acético (40: 50: 10, v/v) por 10 minutos e a descoloração foi realizada com ácido acético a 10% (v/v).

4.1.5. Focalização Isoelétrica: O pI foi determinado por focalização isoelétrica, segundo o método descrito por Vesterbeg (1972), com a colaboração da Profa. Dra. Eliane C. Arantes Braga, FCFRP-USP. Preparo do gel: O gel foi preparado a 5% em poliacrilamida (bis-acrilamida: acrilamida 0,8:30), composto por 10% de sacarose, 1% (v/v) de buffalyte, 0,17% (v/v) de TEMED e 0,075% (m/v) de persulfato de amônio. A polimerização do gel foi realizada em placa de vidro de 12 x 14cm com espessura de 0,07cm. Aplicação das amostras e focalização isoelétrica: O gel foi colocado sobre uma placa refrigerada ligada a um banho a temperatura de 8°C. Cinco tiras de papel Whatman número 3 sobrepostas foram utilizadas para conectar o gel e os eletrodos, sendo o cátodo embebido em uma solução de NaOH 1M e o ânodo em ácido fosfórico 1M. A fonte de alta voltagem foi ajustada para valores de 100V, 40mA e então realizada uma pré-focalização por 30 minutos. Pedacos de papel 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 40mA. A focalização prosseguiu por mais 2 horas a 750V e 40 a 2mA, e por 1 hora e 20 minutos em 150V e 5 a 0mA.

4.1.6. Sequenciamento N-terminal: O seqüenciamento da região N-terminal da proteína foi realizado num microseqüenciador automático de proteína Procise modelo 491, da Applied Biosystem, o qual utiliza o processo químico de

seqüenciamento por clivagem N-terminal, derivado do método desenvolvido por Pehr Edman conforme descrito por Gray (1972). Este processo tem como princípio a reativação específica do terminal amínico da proteína ou peptídeo, com conversão ao PITC e a remoção seletiva deste terminal amínico por uma ciclização intramolecular, enquanto que o restante da molécula permanece intacto. Cada ciclo da degradação remove seqüencialmente um aminoácido do terminal amínico do polipeptídeo. Este processo cíclico que fornece parte da estrutura primária pode ser subdividido em quatro etapas: 1- acoplamento, 2- clivagem, 3-conversão, 4- identificação e quantificação, as quais são realizadas a cada ciclo.

Acoplamento: As amostras livres de quaisquer contaminantes (sais, açúcares, lipídeos, grupos prostéticos, detergentes, etc) foram diretamente aplicadas em suporte contendo membrana de fibra de vidro, a qual é tratada com 15 µL de polibreno e posteriormente seca em fluxo de argônio. O volume de amostra aplicado foi de 15 µL, numa concentração final de 10 nmoL de enzima. O reagente de acoplamento é o fenilisotiocianato (PITC 5%) em n-heptano, sendo este um líquido volátil. Em meio básico (N-metilpiperidina/água/metanol) o PITC reage quantitativamente com grupamentos amínicos livres da proteína ou polipeptídeo, incluindo-se grupamentos amínicos da cadeia lateral, para formar o feniltiocarbamil-derivado (PTC-proteína ou PTC-peptídeo). O reagente básico utilizado faz com que o grupamento amínico terminal fique na sua forma básica e promova o ataque nucleofílico ao reagente de acoplamento fenilisotiocianato (PITC).

Clivagem: O terminal amínico marcado com o PITC torna a ligação peptídica do aminoácido envolvido (do grupamento amínico terminal da proteína) mais lábil e o tratamento ácido em meio anidro, TFA 100% (ácido orgânico forte), promove a quebra desta ligação peptídica, liberando o derivado de aminoácido aminoacilanilintiazolinona (ATZ-aminoácido) e deixando o restante do polipeptídeo intacto. A proteína remanescente é então deixada com um novo N-terminal, o qual será acoplado com o PITC no próximo ciclo. O ATZ-aminoácido a ser analisado será então extraído com solventes (cloreto de butila e acetato de etila) e transferido para o frasco de conversão, disponibilizando dessa forma a estrutura protéica para um novo acoplamento.

Conversão: O aminoácido aminoacilanilintiazolinona (ATZ-aminoácido) é instável e para aumentar sua estabilidade, uma alíquota da solução de TFA 25% é liberada no processo e, por hidrólise converte ATZ-aminoácido à feniltiocarbamil-

derivado (PTC-aminoácido), o qual cicliza a uma forma mais estável, aminoacilfeniltio-hidantoína (PTH-aminoácido). Após a conversão, o solvente utilizado é evaporado, deixando o resíduo seco do PTH-aminoácido, que é então dissolvido em solução aquosa AcN 20% e transferido para o sistema HPLC. Este PTH-aminoácido é então cromatograficamente separado, identificado por absorvância a 269nm e quantificado em um sistema de HPLC “microbore” (coluna PTH C₁₈, de 2,1x220mm com partículas de 5µm). Estas etapas são realizadas automaticamente pelo equipamento e repetidas a cada ciclo, obtendo-se a sequência de aminoácidos do polipeptídeo através de um sistema de coleta de dados do equipamento

Identificação e Quantificação: A identificação e quantificação dos PTH-aminoácidos são realizadas com base em um padrão de 10 pmol de PTH-aminoácidos.

O sequenciamento N-terminal foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. José C. Rosa, FMRP-USP. Os estudos de homologia seqüencial foram realizados utilizando o banco de dados SWISS-PROT (<http://www.expasy.ch/sprot/>).

4.1.7. Análise da composição de aminoácidos: A composição dos aminoácidos foi determinada em amostras da Bpir-I-PLA₂ obtidas em HPLC em fase reversa. Amostras referentes ao pico PI-b obtido da cromatografia de fase reversa foram previamente hidrolisadas com ácido clorídrico (HCl) bidestilado 6N, em fase vapor (BIDLINGMEYER; COHEN e TRAVIS, 1984), seguida de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC), e a separação dos derivados feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) em HPLC, utilizando coluna de fase reversa C18 (Pico-Tag - 3,9x150mm) com monitoração em comprimento de onda em 254nm.

Para quantificar a amostra, baseou-se na área de cada pico de aminoácido, tomando-se como referência a área do pico do padrão de aminoácidos com concentração conhecida, sendo que o padrão foi derivado nas mesmas condições e ao mesmo tempo em que as amostras.

4.2. Caracterização enzimática e farmacológica

4.2.1. Atividade enzimática

4.2.1.1. Atividade fosfolipásica potenciométrica: Foi determinada através de titulação potenciométrica segundo o método descrito por De Haas et al. (1968). Como substrato foi utilizada uma emulsão de gema de ovo em presença de desoxicolato de sódio 0,04M, pH 8,0 e cloreto de cálcio 0,48M. Após adição do cloreto de cálcio a reação é iniciada e se mantém linear por 3 minutos. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com NaOH 0,0818N em pH 8,0, a temperatura ambiente, utilizando-se uma microbureta Gilmont. Uma unidade de atividade fosfolipásica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido graxo por minuto, nas condições de reação.

4.2.1.2. Atividade fosfolipásica sobre lipídeos fluorescentes: Lipídeos fluorescentes em pó foram reconstituídos em 100 μ L de clorofórmio 100%, distribuídos em tubos de vidro e, em seguida, secos sobre um baixo fluxo de N₂. Os lipídeos secos foram então dissolvidos em 150 mM de NaCl, sonicados quatro vezes a 4°C em intervalos de 1 min até a obtenção de uma solução límpida. Uma solução estoque de lipídeos de 1mg/mL foi então preparada e utilizada nos testes. A atividade fosfolipásica da enzima foi avaliada por intensidade de fluorescência, utilizando-se como substratos os lipídios marcados com o fluoróforo NBD (1acil 2-(6-(7-nitro-1,3-benzoxadiazol-4-yl)-amino) –caproyl) : NBD-PC (fosfatidilcolina), NBD-PG (fosfatidilglicerol), NBD-PE (fosfatidiletanolamina) e NBD-PA (ácido fosfatídico). Os testes foram realizados com um volume final de 3,0 mL em Espectrômetro de fluorescência (Hitachi F450) em temperatura ambiente. A excitação e emissão de comprimento de onda foram ajustadas para 460 nm e 543 nm, respectivamente. A reação padrão continha 50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, pH 7,5. Uma leitura prévia no tempo de 2 min foi realizada com todos os componentes exceto a enzima. A atividade enzimática foi então iniciada através da adição da PLA₂ ácida e uma segunda leitura, após 12 min, foi realizada. Para corrigir traços de contaminações indesejáveis nas amostras, o tempo inicial de leitura foi subtraído da leitura da amostra contendo a PLA₂ antes da análise dos resultados. Quando necessário, a mudança ocorrida na intensidade da fluorescência foi convertida para nmoles de produto por minuto (nmoles/min) utilizando uma curva de calibração, preparada hidrolisando-se completamente uma solução de substrato através do tratamento

com hidróxido de sódio. O substrato considerado mais específico para a atividade da enzima Bpir-I-PLA₂ foi utilizado para avaliar a dependência de íons divalentes para a catálise enzimática. A unidade intensidade de fluorescência foi transformada para nmoles/min.

4.2.1.3. Atividade hemolítica indireta: A atividade fosfolipásica foi testada também pelo método de hemólise radial indireta, realizado em placas. Neste método, descrito por Gutiérrez et al. (1988), foi utilizada uma única modificação, a troca da agarose por ágar. O experimento consiste na elaboração de um gel contendo CaCl₂ a 0,01 M, gema de ovo 1:3 v/v PBS, pH 7,2, eritrócitos 1:3 v/v PBS, ágar bacteriológico a 1% e azida de sódio a 0,005%, sendo o volume final completado com PBS. Após a solidificação do gel foram feitos orifícios de tamanho uniforme (0,5 cm de diâmetro) e aplicadas as amostras diluídas em PBS, em volume final de 40µL.

A atividade fosfolipásica da Bpir-I-PLA₂ foi avaliada através de prévia incubação, em diferentes concentrações da enzima (0,01; 0,1; 0,5; 1; 2; 4 e 8µg) e diferentes pHs (2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 7,0; 8,0 e 10,0), durante 30 min a 37°C. Tal atividade também foi avaliada sob diferentes temperaturas (4; 25; 37; 45; 60 e 100°C), com incubação prévia por período de 30 min, e alguns inibidores EDTA (1; 15mM) e BPB (2,5; 5mM), com incubação prévia por período de 30 min a 37°C.

Os géis contendo as amostras foram mantidos em estufa a 37°C por 12 horas. A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel é um indicativo de atividade, onde os halos foram medidos em milímetros para a quantificação da atividade fosfolipásica.

Para a realização do teste foi utilizado sangue bovino cedido por frigorífico da região de Ribeirão Preto-SP. O sangue foi diluído em tampão PBS (30 mL) e as células lavadas 3 vezes com centrifugações de 400xg por 10 minutos, para volumes aproximados de 10 mL de sangue. Após as centrifugações, o plasma e o PBS foram desprezados e as células foram utilizadas na composição do gel. A dose hemolítica indireta mínima (DheM), foi determinada como a dose de amostra (µg) responsável pela formação de um halo de 10 mm.

4.2.2. Atividade anticoagulante: A atividade anticoagulante foi realizada de acordo com o método previamente descrito (ALVARADO e GUTIÉRREZ, 1988), utilizando sangue bovino citratado. Para o ensaio, o sangue foi centrifugado duas vezes a 1000xg a 5°C para se obter o plasma pobre em plaquetas. A atividade teve por

objetivo avaliar o efeito da Bpir-I-PLA₂ sobre o tempo de coagulação do plasma na presença de CaCl₂, em diferentes concentrações. A enzima foi previamente incubada com 200µL de plasma citratado por 1 a 10 min a 37°C sendo posteriormente adicionados 25µL de solução de cloreto de cálcio (0,25mM) e cronometrado o tempo de coagulação em minutos. O valor foi calculado com base na quantidade mínima de enzima capaz de tornar o plasma incoagulável (dose anticoagulante mínima), considerando o tempo mínimo de 45 minutos para tal classificação. Os controles foram realizados adicionando-se 25µL de solução de cloreto de cálcio (0,25mM) a 200µL de plasma citratado.

Para a realização do teste foi utilizado sangue bovino cedido por frigorífico da região de Ribeirão Preto-SP.

4.2.3. Atividade miotóxica: Grupos de 6 camundongos machos *Swiss* (18-22g) foram injetados via intramuscular (i.m) no músculo gastrocnêmio direito com diferentes doses do veneno bruto de *B. pirajai* ou das proteínas isoladas, dissolvidos em 50 µL de PBS. Os controles negativos receberam somente PBS. Três horas depois, o sangue dos camundongos foi coletado, por pequeno corte na extremidade da cauda, em capilares heparinizados e imediatamente centrifugados por 20 min a 1.530 *xg*. A atividade da enzima creatina cinase foi determinada utilizando-se 4 µL de plasma incubados com 1,0 mL de reativo do kit CK-NAC cinético (Bioclin) dissolvido em água destilada, por 3 min a 37°C, através de leituras em espectrofotômetro a 340 nm. O princípio deste método consiste: 1- na reação da creatina fosfato e a adenosina fosfato (ADP), catalisada pela enzima creatina cinase, formando creatina e adenosina trifosfato (ATP); 2- o ATP formado é utilizado para fosforilar a glicose, produzindo glicose-6-fosfato (G-6-P) na presença da hexocinase; 3- A glicose-6-P é oxidada a gluconolactona-6-fosfato na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺), sendo esta reação catalizada pela glicose-6-fosfato desidrogenase; 4- Nesta reação o NADP⁺ é reduzido a NADPH aumentando a absorbância em 340nm. A variação em absorbância é diretamente proporcional à atividade da enzima creatina cinase. A atividade foi expressa em unidades/litro. Uma unidade consiste no resultado da fosforilação de um nanomol (nmol) de creatina por minuto (SOARES et al., 2000a).

4.2.4. Indução de edema em camundongos: Grupos de 05 camundongos *Swiss* machos (18-22g) foram injetados via intradérmica (i.d) na região subplantar da pata direita posterior com 50 μ L de soluções contendo diferentes doses das amostras (Bpir-I-PLA₂, Bpir-I-PLA₂ + BPB, PrTX-III e veneno bruto de *B. pirajai*), dissolvidas em PBS. A mensuração da espessura das patas foi realizada antes da inoculação das amostras (tempo 0h). Os controles negativos foram realizados com injeções de 50 μ L de PBS por animal, os quais foram também medidos. Em seguida, realizou-se a mensuração das patas em diferentes intervalos de tempo após as administrações, 30 min, 1h e 3h (de cada valor obtido foram subtraídos os valores inicialmente aferidos no tempo 0h e os valores obtidos a partir de animais inoculados somente com PBS). Os valores obtidos para os animais que receberam injeção de veneno bruto foram considerados como 100% de edema induzido. O aumento do volume nas patas dos camundongos foi medido com um paquímetro de baixa pressão 0.01 mm (Mytutoyo, Japão) e expresso em porcentagem de edema induzido (SOARES et al., 2000a).

4.2.5. Efeitos em plaquetas: O sangue foi coletado da artéria central da orelha de coelhos sadios e imediatamente acondicionado em tubos contendo citrato de sódio (0,31 % w/v, concentração final), como anticoagulante. O sangue foi centrifugado a 350 xg por 12 minutos em tubos plásticos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e denominado plasma rico em plaquetas (PRP). O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido após centrifugação do sangue a 1370 xg por 5 minutos, também a temperatura ambiente. Os testes de agregação plaquetária foram realizados a 37°C em cubetas de vidro siliconizadas com alíquotas de 250 μ L de PRP, mantidas sob constante agitação por 2 minutos antes da adição de qualquer indutor. A agregação foi monitorada fotometricamente em um “Whole Blood Lumi-Aggregometer” (Chrono-log Corp.), acoplado a um registrador de canais. Para os ensaios foram testadas várias concentrações da enzima isolada Bpir-I-PLA₂ na presença de CaCl₂ a 1 mM (concentração final) e também do agonista (ADP (adenosina difosfato) ou colágeno). Experimentos controle foram feitos na presença somente dos agonistas. Concentrações sub-máximas dos agonistas resultaram na obtenção de 100 % de agregação plaquetária, enquanto que 0 % de agregação plaquetária foi obtido pela variação de transmitância do PRP sozinho. O efeito inibitório da PLA₂ na agregação plaquetária foi expresso como a diferença em percentual da resposta máxima obtida na presença da PLA₂, em comparação com o

valor obtido no controle. Para o teste de inibição da atividade da enzima, foi utilizado um inibidor de fosfolipases (BPB 5mM), procedendo com incubação prévia deste com a proteína por 2 - 3 minutos em 37°C. Experimentos realizados em colaboração com o Prof. Dr. André Fuly, UFF-RJ.

4.2.6. Atividade antitumoral de Bpir-I-PLA₂: Foram testadas culturas de células das seguintes linhagens da ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, MD, USA): SK-Br-3, cultura de células de adenocarcinoma de mama humano; Jurkat, de células de leucemia linfoblástica T humana e EAT, de células de tumor ascítico murino de Ehrlich. As linhagens foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Auro Nomizo e os ensaios realizados em colaboração com o mesmo na FCFRP-USP. Todas as linhagens foram mantidas em meio de cultura RPMI (Gibco-BRL) suplementado com 10% de SBF (soro bovino fetal), 20mM de L-glutamina e 10µg/mL de gentamicina, permanecendo em estufa de CO₂ a 5% a 37°C após serem descongeladas.

A atividade citotóxica da enzima Bpir-I-PLA₂ foi avaliada pelo método de MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) conforme descrito por Mosmann (1983), que avalia as células viáveis após incubação com elemento citotóxico.

As células foram cultivadas em frascos apropriados e mantidas em fase exponencial de crescimento. As culturas de células aderentes foram então destacadas com tripsina a 0,05% e 0,02% de EDTA em PBS livre de cálcio e lavadas com meio RPMI em centrífuga a 800xg/15min a 10°C. A concentração de células foi determinada em câmara de Neubauer, ajustada e colocada em placas de cultura de 96 poços para que cada poço contivesse 1 x 10⁵ células. Depois de 24 horas de cultivo, o meio foi removido e, diferentes concentrações das amostras de proteína e droga controle foram adicionadas e incubadas por 24h. Após este período 20µL de MTT a 10mg/mL foram adicionados aos poços e incubados por mais 4 horas para que as células viáveis incorporassem o tetrazolium. Finalmente, 50µL de dodecil sulfato de sódio a 20% foram adicionados em cada poço, no intuito de dissolver os cristais de formazan formados no meio de cultura, sendo as placas novamente incubadas a 37°C por 12 horas no escuro. Foi utilizada como controle positivo a droga metotrexato (MTX). Os controles negativo (célula e meio RPMI) e branco (meio RPMI) também foram mensurados.

Após este período, foram feitas as leituras das placas em espectrofotômetro de microplacas no comprimento de onda de 570 nm. A taxa de citotoxicidade foi calculada com a seguinte equação: % de toxicidade dos compostos = $1 - \text{absorbância do poço tratado} / \text{absorbância do poço controle} \times 100$.

4.2.7. Atividade Hipotensora: Ratos *Wistar* (240-280g) foram anestesiados com uretana (1.2g/Kg, i.p.), a artéria carótida e a veia jugular foram cirurgicamente isoladas e canuladas usando catéteres de polietileno para, respectivamente, medir a pressão sanguínea e realizar administração das amostras por via endovenosa (i.v), respectivamente.

Mediu-se a pressão usando um amplificador de sinal de pressão sanguínea modelo 7450A (HP, USA) conectado a um sistema de coleta de dados computadorizados (di 190, Dataq, USA). O veneno bruto e a PLA₂ ácida isolada foram dissolvidos em PBS e diferentes doses foram injetadas (i.v), para gerar uma curva dose-efeito. Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Fernando M. Corrêa, do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP.

4.2.8. Atividade microbicida e na leishmanicida

Para o teste de atividade antibacteriana foram utilizadas cepas de *Staphilococcus aureus* (ATCC 25923). Em 1,0 mL de bactérias a $1,2 \times 10^6$ UFC (unidades formadoras de colônias/tubo) adicionou-se meio BHI seguido de diferentes concentrações de Bpir-I-PLA₂ e incubação a 37 °C por períodos de 30 minutos. A leitura da concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração da enzima capaz de inibir o crescimento bacteriano, foi realizada visualmente pela turvação do meio em macro-diluições. A técnica de diluição em placa permite avaliar o número de unidades formadoras de colônias que cresceram em placas com meio sólido de Muller-Hinton por 20 minutos, 1 h e 24 horas, após incubação com a Bpir-I-PLA₂ em diferentes concentrações.

Para a avaliação da atividade *anti-Leishmania*, foram utilizadas cepas de *Leishmania braziliensis* e de *Leishmania amazonensis*. Cerca de 3×10^6 parasitas foram incubadas com a Bpir-I-PLA₂ e após 30min foram pulsadas com timidina. 24 horas após a incubação avaliou-se a incorporação de timidina pelos parasitas

viáveis. Esta atividade foi realizada em colaboração com Profa. Dra. Marta C. Monteiro-FMRP/USP.

4.2.9. Modificação Química da Fosfolipase A₂ pela alquilação da His48:

aproximadamente 3,0mg da enzima, foram dissolvidos em 1,0mL de tampão bicarbonato de amônio 0,1M, pH 8,0, 0,7mM EDTA. Adicionaram-se 150µL de uma solução de 0,8mg/mL de brometo de p-bromofenacila (BPB) em etanol, incubando-se a temperatura ambiente por 24 horas (SOARES et al., 2000a). Após esta incubação, o excesso do reativo foi retirado utilizando um sistema AMICON membrana YM-3, através de sucessivas lavagens com tampão AMBIC 0,05M pH 8,0. A amostra de proteína modificada foi então liofilizada e submetida aos ensaios de hemólise indireta, atividade anticoagulante, edematogênica, efeito sobre a pressão arterial e efeito sobre plaquetas.

4.3. Estudo estrutural da fosfolipase A₂ ácida

4.3.1. Determinação da seqüência completa do cDNA da PLA₂ por biologia molecular

4.3.1.1. Extração e preparação do RNA total das glândulas veneníferas da

serpente *Bothrops pirajai*: Um exemplar adulto desta espécie foi decapitado e as glândulas de veneno retiradas e maceradas imediatamente em nitrogênio líquido. Após a evaporação do N₂, foi adicionado ao tecido macerado TRIZOL[®] LS Reagent ultra pure[™] (100mL) LIFE Technologies. O RNA total obtido foi dissolvido em 20µL de água milli-Q estéril e armazenado a -70°C, por curto período de tempo até a realização do RT-PCR.

4.3.1.2. Construção e preparação dos oligonucleotídeos: Os *primers* (oligonucleotídeos) usados foram desenhados de acordo com a seqüências N-terminal anteriormente sequenciada e o C-terminal através de alinhamentos múltiplos com outras svPLA₂s (sequencia depositadas no NCBI-GenBank/Swiss Prot) de forma que, após a amplificação, a seqüência do cDNA contivesse os sítios de restrição para as enzimas *BamHI* e *NdeI*.

Figura 6. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do cDNA da PLA₂ por PCR. As sequências em verde e azul mostram os sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *BamHI*, respectivamente. As setas vermelhas, os sítios de clivagem destas enzimas. ATG em roxo, sequência de iniciação e TTA em rosa, “stop” códon.

4.3.1.3. Síntese do cDNA e amplificação por PCR: A partir do RNA isolado foi realizada a síntese do cDNA. O RNA total (5µL) foi submetido à reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita do cDNA da toxina na presença de transcriptase reversa e oligo dT durante 1 hora a 42°C. A segunda fita foi sintetizada utilizando-se 2µL da reação descrita acima, combinados com os *primers* específicos (PLA₁ - *forward* e PLA₂ - *reverse*), para amplificar o gene de interesse, inserindo os sítios de restrição para *BamHI* e *NdeI* na sequência, para posterior clonagem no plasmídeo pUC99. A amplificação foi realizada utilizando-se o *kit ABI Prism® Big Dye™ Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin Elmer)*, conforme as especificações do fabricante. A amplificação do cDNA obtido foi realizada por reação em cadeia de polimerase na presença da enzima transcriptase reversa (RT-PCR), com 25 ciclos de reação de: 95°C por 10 segundos, 50°C por 20 segundos, 72°C por 4 minutos; após este intervalo as amostras foram mantidas a -4°C. A reação de seqüenciamento foi adicionada 80µL de isopropanol a 75%, seguido de incubação por 15 min a temperatura ambiente. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 4000 *xg* por 45 min a 5°C. A eletroforese foi realizada no

aparelho *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (Perkin Elmer), usando gel de poliacrilamida a 4%, uréia 6 M, sendo conduzida a 1500V, temperatura de 51°C, durante 7 horas. Os eletroferogramas obtidos foram analisados através do programa *ABI Analysis Data Collection* e as seqüências foram posteriormente analisadas através do *software Sequencher versão 3.1* e o programa de Blast do NCBI.

4.3.1.4 Preparo de bactérias competentes: As bactérias *Escherichia coli* DH5α competentes foram preparadas utilizando-se o método do CaCl₂ descrito por Sambrook et al. (1989). O método consiste em colocar uma colônia isolada para crescer em 5mL de meio de cultura líquido, LB (*Luria Bertani*), “overnight” em estufa sob agitação (1.530xg) a 37°C, seguindo-se incubação de 0,5mL desta cultura em 50mL de mesmo meio em mesma agitação e temperatura, por período de 3 a 4h até a densidade óptica da cultura atingir 0,3 a 0,4 em 600nm. Em seguida, 30mL da cultura de células são centrifugados em tubo estéril (2.090xg por 15min a 4°C). Descarta-se o sobrenadante e as células são ressuspensas em 15mL de solução Tris-Cálcio, permanecendo em gelo por 20min. Após este período, as células são novamente submetidas à centrifugação com rotação de 2.090xg por mesmo período e em mesma temperatura, o sobrenadante é novamente descartado e as células ressuspensas em 1mL de solução Tris-Cálcio, permanecendo no gelo por aproximadamente 45min. As células são então consideradas competentes podendo ser guardadas no gelo por até 24h ou armazenadas a -70°C.

4.3.1.5 Clonagem do cDNA da PLA₂ ácida em *E. coli*: Como descrito anteriormente, o cDNA que codifica para a fosfolipase A₂ ácida Bpir-I-PLA₂ foi amplificado utilizando os *primers* específicos: PLA₂ forward (cgcatatgagcctgtggcaatttgggaag) e reverse (gcggatccttagcatggctctgacttctcc), contendo sítios de restrição para *NdeI* e *BamHI* na sua extremidade 5' e 3', respectivamente. Este fragmento foi clonado no vetor pUC99, derivado do vetor de clonagem pUC19, e o plasmídeo recombinante resultante foi inserido em bactérias *E. coli* DH5α competentes transformadas pelo método da eletroporação conforme descrito por Hanahan (1985), sendo selecionadas em meio contendo ampicilina e visualizadas com o acréscimo de IPTG e X-Gal no meio de cultura. Após a

transformação, as colônias de bactérias recombinantes foram analisadas por PCR e eletroforese em gel de agarose 1,2% para confirmação da clonagem.

Figura 7. Mapa de restrição do vetor de clonagem pUC99. Demonstrando os sítios de restrição para as enzimas *BamHI* e *NdeI* (setas em xadrez).

4.3.1.6 Transformação das bactérias competentes: A transformação foi realizada pelo método da eletroporação conforme descrito por Hanahan (1985). O método consiste em colocar o vetor recombinante (2µL) juntamente com as células competentes (40µL), sendo todos os procedimentos realizados em gelo. A mistura deve ser agitada levemente, transferida para a cubeta de eletroporação e as células submetidas a um pequeno choque no eletroporador. Em seguida é adicionado 1mL de meio LB líquido e toda a solução é transferida para um tubo permanecendo em estufa a 37°C a 1.060xg durante 1h. Desta solução de células transformadas, cada 100µL foram plaqueados em placas de petri contendo meio LB sólido acrescido de ampicilina, que permite o crescimento apenas das células transformadas que se apresentam resistentes a este antibiótico devido ao gene de resistência presente no plasmídeo por elas adquirido.

4.3.1.7 Purificação de plasmídeos e digestão: As bactérias transformadas, crescidas em meio sólido contendo ampicilina, foram colocadas para crescer *overnight* sob agitação de 500xg a 37°C (em 3 mL de meio LB contendo ampicilina 0,1%), posteriormente centrifugadas para abaixar o precipitado, que foi utilizado para a purificação de plasmídeos pelo Kit QIAGEN PLASMID MINI Handbook – 100, segundo protocolo otimizado. A digestão, com as enzimas *NheI* e *BamHI*, de uma alíquota dos plasmídeos purificados das colônias de *E. coli* foi realizada para confirmação, em gel de agarose 1,2%, da presença do cDNA da proteína de interesse. Como padrão de peso molecular foram utilizados 10µL de Hind III *fragments*, 90µL (preparado em água e tampão TAE – composto por Tris, ácido acético e EDTA) Foram realizados: uma PCR e posterior precipitação e purificação de seu produto precedendo o sequenciamento.

4.3.1.8 Reação de seqüenciamento de cDNA por produto de PCR: Os produtos da PCR foram submetidos ao seqüenciamento direto, usando o kit *ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Perkin Elmer). Foram utilizados *primers* que amplificam regiões presentes no plasmídeo. O protocolo de reação foi conduzido conforme as especificações do fabricante, com 25 ciclos de reação de: 95°C por 10 segundos, 50°C por 20 segundos, 72°C por 4 minutos; após este intervalo as amostras foram mantidas a -4°C. À mistura de seqüenciamento foram adicionados 80 µL de isopropanol a 75%, seguido de incubação por 15 min a temperatura ambiente. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 1.060xg por 45 min, a 5°C, sendo realizada uma lavagem com etanol 70% gelado e em seguida incubação em estufa a 37°C por 1 hora. A eletroforese seguiu em um aparelho *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (Perkin Elmer), usando gel de poliacrilamida a 4%, uréia 6M, sendo conduzida a 1500V, temperatura de 51°C, durante 7 horas. Os eletroferogramas obtidos foram analisados através do programa *ABI Analysis Data Collection* e as seqüências posteriormente analisadas através do *software Sequencher versão 3.1*.

4.3.1.9 Análise computacional das seqüências: A seqüência de cDNA e de aminoácidos da fosfolipase A₂ obtida de *B. pirajai* foi analisada quanto à homologia com outras seqüências de fosfolipases A₂ previamente depositadas no banco de

dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), GenBank e SwissProt, para nucleotídeos e aminoácidos. Adicionalmente foi realizado o alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos através da utilização do programa *Clustal W multiple Alignment* (THOMPSON et al., 1994).

4.3.2. Clonagem do cDNA da Bpir-I-PLA₂ em vetor de expressão

4.3.2.1. Isolamento do cDNA completo. A seqüência completa da PLA₂ ácida como descrita anteriormente foi clonada em pUC99, utilizando-se os sítios de restrição *Bam*HI e *Nde*I nas extremidades 5' e 3', respectivamente, utilizando-se como célula hospedeira *E. coli* DH5 α . Para a expressão desta proteína, foi realizada a subclonagem do fragmento *Bam*HI/*Nde*I em vetores de expressão do sistema pET-21a. Uma vez efetuada a ligação plasmídeo-inserto, foi realizada uma transformação, em células competentes previamente preparadas, de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Essa hospedeira apresenta resistência ao antibiótico cloranfenicol na concentração de 34 μ g/mL, devido à presença do plasmídeo pLys.

As células competentes da linhagem hospedeira foram preparadas conforme o método do CaCl₂ descrito por Cohen et al. (1972) e a transformação foi induzida por choque térmico. Cerca de 5 μ L do produto da ligação foram adicionados a 100 μ L de suspensão de células hospedeiras competentes e os tubos incubados em gelo por uma hora. Em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 2 minutos; incubadas em meio de cultura LB líquido a 37°C por uma hora e, em seguida, plaqueadas em meio de cultura LB sólido contendo 34 μ g/mL de cloranfenicol e 100 μ g/mL de ampicilina. Após incubação a 37°C *overnight* as colônias transformantes foram analisadas.

Figura 8. Mapa de restrição do vetor de expressão pET-21a. Demonstrando os sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Nde*I (setas rochas).

4.3.2.2. Análise das colônias transformantes. Os clones foram incubados em 3mL de meio de cultura LB líquido contendo ampicilina e cloranfenicol e incubados por 14 horas a 37°C. Em seguida, foi realizada uma extração de DNA plasmidial utilizando o “Kit Concert™ Rapid Plasmid – Miniprep System” (GibcoBRL) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração dos plasmídeos, a qualidade do DNA plasmidial foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose. As amostras foram submetidas a uma PCR com os *primers* desenhados, nas mesmas condições já descritas, seguida pela análise em eletroforese. As amostras positivas foram seqüenciadas utilizando o *primer* do promotor T7. O seqüenciamento e a análise das seqüências foram realizados conforme descrito anteriormente.

4.3.2.3. Expressão da proteína recombinante. A expressão foi induzida pela adição de IPTG. Vários testes foram realizados em busca das melhores condições de expressão em pET-21a, alterando-se os constituintes do meio de cultura, pH, concentração de IPTG, temperatura e o tempo de indução da proteína

recombinante. Os estudos de expressão foram realizados com células *E coli* BL21 (DE3)pLysS transformadas com os plasmídeos recombinantes derivados do pET-21a. A expressão foi iniciada com as construções em pET-21a, inoculando uma colônia dos clones em 50mL de meio de cultura LB líquido acrescido de cloranfenicol e ampicilina, mantendo-se a cultura sob agitação a 1.200xg, a 37°C. A proliferação foi monitorada pela medida da absorbância a 600nm, e quando a cultura atingiu 0,6-1,0 UAbs (aproximadamente 3 horas), foi adicionado o IPTG na concentração de 1mM sendo o cultivo mantido por mais 4 horas. Simultaneamente, foi feito um controle não induzido, sem a adição do IPTG, nas mesmas condições, segundo protocolo previamente descrito (ROBERTO et al., 2004).

4.3.2.4. Análise da expressão da Bpir-I-PLA₂ em gel de poliacrilamida.

Decorrido o tempo de indução, 1mL do meio de cultura foi centrifugado e o sedimento lavado com solução contendo Tris-HCl 50mM pH 8,0, EDTA 20mM, uréia 0,5M e triton X-100 0,5%. Esta etapa de lavagem do sedimento é realizada sob agitação em agitador tipo vórtex por alguns minutos, seguida de centrifugação por 3 min a 6.800xg e à temperatura ambiente. O sedimento contendo os corpos de inclusão foi novamente ressuspenso em 100µL de água MilliQ estéril e 10µL analisado por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), juntamente com os controles não induzidos. O restante do meio de cultura foi centrifugado por 30 minutos a 6.800xg e as células contendo os corpos de inclusão foram armazenadas a -70°C. O gel de poliacrilamida foi confeccionado a 12%, utilizando SDS como agente desnaturante segundo método descrito por Laemmli (1970). O gel de concentração foi preparado a 6% em poliacrilamida (acrilamida e bisacrilamida 19:1) em tampão Tris-HCl 1,5M pH6,8, SDS 10%, persulfato de amônio 10% e TEMED, e o gel de separação a 12% poliacrilamida foi preparado em tampão Tris-HCl 1M pH 8,8, SDS 10%, persulfato de amônio 10% e TEMED. As amostras (10µL contendo corpos de inclusão) foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5M pH 6,5; SDS 2%; β-mercaptoetanol 3,5% e azul de bromofenol 1mg/mL) fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-glicina 1X pH 8,3 a 90V por aproximadamente 2,5 horas, até o indicador azul alcançar o final do gel. O gel foi corado em uma solução de azul de Coomassie

(metanol 50%, ácido acético 10% e *Coomassie Blue* 0,2%), por 10 minutos e depois descorado em ácido acético 10%.

4.3.2.5. Purificação e redobramento da proteína recombinante

Extração e purificação da PLA₂ dos corpos de inclusão. Os sedimentos de células induzidas contendo a proteína recombinante na forma de corpos de inclusão, armazenados a -70°C, passaram por duas etapas de sonicação em tampão contendo Tris-HCl 50mM pH8,0, EDTA 20mM, uréia 0,5M e Triton X-100 0,5% para uma completa homogeneização, seguida de centrifugação (4.000xg por 10 min). O homogenato foi distribuído em tubos de 2mL e submetidos novamente à centrifugação (4.000xg por 5 min) para eliminar o excesso de tampão. Após a sonicação, o sedimento contendo os corpos de inclusão foi tratado com 1mL de tampão Tris-HCl 50mM pH8,0 contendo uréia 3M e EDTA 20mM por 30 min a 37°C. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 20.000xg e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspensionado em 500µL do tampão de modificação (300µL NTSB, 0,283g tiocianato de guanidina) e incubado por 1 hora à temperatura ambiente para completa dissolução. Em seguida as amostras foram aplicadas em colunas de filtração em gel (1,6 X 2,5 cm) empacotadas com uma resina de exclusão molecular BioGel P6 (BIORAD). A coluna foi equilibrada com tampão contendo Tris-HCl 50mM pH8,0/EDTA 1mM, e a proteína eluída com tampão Tris-HCl 20mM pH8,0, EDTA 2mM e hidrocloreto de guanidina 2M, segundo protocolo previamente descrito (WARD et al., 2001). O pico de proteína eluída detectado por absorbância em 280nm serviu como amostra para o redobramento.

Redobramento e Purificação da PLA₂ recombinante. O redobramento da proteína recombinante foi conduzido *in vitro* em fase sólida em coluna de filtração em gel (1,5 x 2,5 cm) empacotada com a mesma resina de exclusão molecular BioGel P6 (BioRad) equilibrada com 12mL de tampão de redobramento contendo Tris-HCl 20mM pH8,0, hidrocloreto de guanidina 0,3M, cisteína 6mM e cistina 3mM. Após aplicação da amostra protéica na resina de adsorção, a coluna foi mantida por aproximadamente 16 horas em incubação à temperatura ambiente. Em seguida, a coluna foi lavada com 10mL de tampão Tris-HCl 50mM, pH 8.0 contendo EDTA 1mM e hidrocloreto de guanidina 0,3M, para eluição da proteína. As amostras coletadas foram diluídas em 10mL de tampão contendo Tris-HCl 50mM contendo hidrocloreto

de guanidina 0,3M, cistina 3mM e de cisteína 6mM e mantidas à temperatura ambiente com agitação moderada durante 48 horas para permitir a renaturação. Decorrido o tempo de redobramento, as amostras foram purificadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC – Shimadzu), equipado com coluna de troca aniônica (Asahipack ES502N) e detector U.V., previamente programado para um gradiente linear de 0-100%, de NaCl 2M em 20 minutos. Utilizou-se no reservatório A tampão de eluição com Tris-HCl 50mM pH 8,0 e no reservatório B tampão de eluição com Tris-HCl 50mM pH 8,0 contendo NaCl 2M com um fluxo de 0,5mL/minuto. As frações eluídas no intervalo de 20 a 40 minutos foram coletadas. O perfil cromatográfico da Bpir-I-PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops pirajai*, obtido na mesma coluna sob as mesmas condições, foi utilizado como padrão de comparação. A proteína recombinante foi submetida aos testes de atividade enzimática e efeito sobre plaquetas.

4.3.3. Modelagem protéica: Todos os alinhamentos entre a seqüência da Bpir-I-PLA₂ e as outras moléculas homólogas depositadas no banco de dados estrutural, foram gerados usando o programa HHpred (SÖDING, BIEGERT e LUPAS, 2005), acessível pelo Instituto Max-Planck do servidor Desenvolvimento da Biologia (<http://protevo.eb.tuebingen.mpg.de/toolkit>). A estrutura da BthA-I-PLA₂, uma fosflipase A₂ ácida do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (MAGRO et al., 2004; 2005), foi selecionada e usada como molde pelo programa MODELLER 8v2 (MARTI-RENO et al., 2000) para construir o modelo inicial da Bpir-I-PLA₂, apresentado na forma RIBBON. Estudos realizados em colaboração com o Prof. Dr. Marcos R. M. Fontes, UNESP, Botucatu-SP.

4.4. Análise estatística dos resultados: Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste não-pareado *t*-Student, com valor *p* <0,05 considerado como significativo.

5. Resultados

5.1. Caracterização Bioquímica

5.1.1. Isolamento da Fosfolipase A₂ ácida do veneno de *Bothrops pirajai*

O veneno total da serpente *Bothrops pirajai*, submetido à cromatografia de troca iônica em resina de CM-Sepharose, demonstrou a presença de oito picos principais, designados P-I, P-Ib, P-II, P-III, P-IV, P-V, P-VI, P-VII (Figura 9A).

O pico P-Ib liofilizado, correspondente a fração ácida com maior atividade fosfolipásica e alta concentração de proteínas de $M_r \cong 14.500$ (resultado não apresentado), foi submetido à HPLC de fase reversa (Figura 9B), obtendo-se a fosfolipase A₂ Bpir-I-PLA₂ em alto grau de pureza (Figura 9C).

Figura 9. Isolamento da PLA₂ ácida do veneno de *Bothrops pirajai*. **(A)** Cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose de 200mg do veneno de *Bothrops pirajai*. As frações são identificadas como P-I a P-VII. A amostra foi eluída a partir de gradiente linear com tampão bicarbonato de amônio (0,05-1,0 M), a um fluxo de 0,5mL/min, coletando-se frações de 3,5mL/tubo. **(B)** Perfil cromatográfico obtido a partir de HPLC de fase reversa C18. A amostra, 10mg de P-Ib, foi eluída utilizando solventes de corrida (solvente A - acetonitrila 5%, TFA 0,1%; solvente B - acetonitrila 60%, TFA 0.1%) em gradiente de concentração de 30-100% de solvente B, com um fluxo de 1mL/min durante 70 min. **(C)** Avaliação do grau de pureza RP-HPLC nas mesmas condições.

5.1.2. Determinação do peso molecular (SDS-PAGE) e ponto isoeletrico

A Bpir-I-PLA₂ isolada apresentou alto grau de pureza (Figura 10) e massa molecular relativa próxima a 14.500, para o monômero, na presença de agentes redutores e 28.000 na forma de dímero, em condições não redutoras.

A eletrofocalização demonstrou também uma única banda para a fosfolipase A₂ ácida de interesse, revelando pI aproximado de 4,9.

Figura 10. Análise eletroforética para verificação do grau de pureza da fosfolipase A₂ ácida, Bpir-I-PLA₂, isolada do veneno de *B. pirajai*, e focalização eletroforética **(A)** SDS-PAGE a 12%. Amostras: 1. PPM; 2. Bpir-I-PLA₂ com redutor (15 µg); 3. Bpir-I-PLA₂ com redutor (30 µg); 4. Bpir-I-PLA₂ sem redutor (15 µg); 5. Bpir-I-PLA₂ sem redutor (30 µg). **(B)** PAGE para proteínas ácidas a 10%. Amostras: 1. Veneno bruto de *B. pirajai* (20µg); 2. PLA₂ ácida de *B. alternatus* (30µg); 3. Bpir-I-PLA₂ de *B. pirajai* (20µg). **(C)** Focalização isoeletrica. O pI foi determinado por focalização isoeletrica, segundo o método descrito por Vesterbeg (1972). O gel foi preparado a 5% em poliacrilamida (bis-acrilamida: acrilamida 0,8:30), composto por 10% de sacarose, 1% (v/v) de buffalyte, 0,17% (v/v) de TEMED e 0,075% (m/v) de persulfato de amônio.

5.1.3. Sequenciamento N-terminal e estudo de homologia

Os vinte primeiros resíduos de aminoácidos representantes da região N-terminal da Bpir-I-PLA₂ foram seqüenciados e então comparados com a mesma região protéica de outras fosfolipases A₂ ácidas de venenos de serpentes (Figura 11). As seqüências N-terminal das PLA₂s analisadas foram obtidas do banco de dados do *NCBI*, de proteínas com seqüências previamente determinadas e depositadas, e mostraram um alto grau de similaridade com a Bpir-I-PLA₂.

Espécie/PLA ₂	Seqüência N-terminal																			Número de acesso	Referência	
	1																		20			
<i>Bothrops pirajai</i> / Bpir-I-PLA ₂	N	L	W	Q	F	G	K	L	I	M	K	I	A	G	E	S	G	V	F	K	_____	1
<i>Bothrops insularis</i> / BinTX-I	N	L	W	Q	F	G	K	M	M	N	Y	V	M	G	Q	S	V	V	Y	K	Q8QG87	2
<i>Bothrops jararaca</i> /BJ-PLA ₂	D	L	W	Q	F	G	Q	M	M	N	D	V	M	R	E	Y	V	V	F	N	P81243	3
<i>Bothrops erythromelas</i> /BE-I-PLA ₂	S	L	V	Q	F	E	T	L	I	M	K	I	A	G	R	S	G	V	W	Y	ABC96692	4
<i>Bothrops jararacussu</i> /BthA-I-PLA ₂	S	L	W	Q	F	G	K	M	I	N	Y	V	M	G	E	S	G	V	L	Q	1UMV	#
<i>Bothrops jararacussu</i> /SIISPIIA	S	L	W	Q	F	G	K	M	I	D	Y	V	M	G	E	E	G	A	K	S	_____	5
<i>Bothrops jararacussu</i> /SIISPIIB	S	L	W	Q	F	G	K	M	I	F	Y	T	G	K	N	E	P	V	L	S	_____	5
<i>Bothrops jararacussu</i> /SIISPIIIA	S	L	W	Q	F	G	K	M	I	L	Y	V	M	G	G	E	G	V	K	Q	_____	5
<i>Bothrops jararacussu</i> /SIISPIIIB	S	L	W	Q	F	G	K	M	I	F	Y	E	M	T	G	E	G	V	L	-	_____	5
<i>Bothrops pauloensis</i> / Bp-PLA ₂	N	L	V	Q	F	K	T	L	I	M	K	I	A	G	R	S	V	V	Y	K	_____	6
<i>Crotalus v. viridis</i> / PLA ₂	S	L	V	Q	F	E	T	L	I	M	K	I	A	G	R	S	G	L	L	W	AF403137	#
<i>Crotalus atrox</i> / PLA ₂	S	L	V	Q	F	E	T	L	I	M	K	I	A	G	R	S	G	L	L	W	AF269131	#
<i>Agkistrodon halys pallas</i> /PLA ₂	S	L	I	Q	F	E	T	L	I	M	K	V	A	K	K	S	G	M	F	W	P14418	7
<i>Naja naja</i> /PLA ₂	N	L	Y	Q	F	K	N	M	I	K	C	T	V	P	S	R	S	W	W	D	P15445	8

Figura 11. Análise comparativa da seqüência N-terminal da enzima Bpir-I-PLA₂ de *B. pirajai* com outras PLA₂s ácidas de venenos de serpentes. Legenda: Resíduos grifados: altamente conservados. Referências: 1-Este trabalho; 2- COGO et al., 2006; 3- SERRANO et al., 1999; 4- DE ALBUQUERQUE MODESTO et al., 2006; 5- KETELHUT et al., 2003; 6- RODRIGUES et al., 2007; 7- WANG et al., 1996; 8- DAVIDSON e DENNIS, 1990. # Seqüência obtida diretamente do *EMBL/GenBank/DBJ data bases*.

5.1.4. Análise de aminoácidos

Na análise da composição de aminoácidos da Bpir-I-PLA₂, comparada com outras fosfolipases A₂ ácidas, Bmoo-I-PLA₂ de *Bothrops moojeni* e BthA-I-PLA₂ de *Bothrops jararacussu*, representada na Tabela 4, foi verificado um alto conteúdo de aminoácidos carregados negativamente (Asp, Glu) e não carregados como Gly, Leu e Tyr. A presença de 14 cisteínas, evidencia provavelmente a presença de 7 pontes dissulfeto.

Tabela 4. Análise comparativa da composição em aminoácidos das fosfolipases A₂ ácidas isoladas de *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. pirajai*.

Aminoácido	Bmoo-I-PLA ₂	BthA-I-PLA ₂	Bpir-I-PLA ₂
Ala	5.12 (5)	5.32 (5)	4.89 (5)
Arg	3.95 (4)	4.15 (4)	3.75 (4)
Asn	9.21 (9)	8.01 (8)	8.55 (8)
Asp	18.89 (19)	18.19 (18)	18.49 (18)
Cys	14.02 (14)	13.82 (14)	13.68 (14)
Gln	1.95 (2)	1.05 (1)	1.88 (2)
Glu	6.22 (6)	6.12 (6)	5.89 (6)
Gly	9.31 (9)	9.41 (9)	8.91 (9)
His	0.91 (1)	1.09 (1)	0.78 (1)
Ile	3.36 (3)	3.26 (3)	3.01 (3)
Leu	9.25 (9)	9.05 (9)	8.89 (9)
Lys	9.78 (10)	8.98 (9)	8.78 (9)
Met	0.97 (1)	0.97 (1)	0.75 (1)
Phe	1.06 (1)	2.06 (2)	2.04 (2)
Pro	4.93 (5)	4.97 (5)	5.12 (5)
Ser	2.77 (3)	4.87 (5)	4.45 (5)
Thr	5.26 (5)	5.06 (5)	4.87 (5)
Trp	nd	nd	nd
Tyr	8.15 (8)	9.75 (10)	9.05 (9)
Val	6.35 (6)	5.12 (5)	5.45 (5)
Total	120 + Trp	120 + Trp	120 + Trp
Mr	14.000 ^a	13.500 ^a	14.500 ^a
pI	5.2 ^b	4.5 ^b	4.9 ^b

^aSDS-PAGE; ^bfocalização isoelétrica e nd, não determinado.

Entre parêntesis os números considerados integrais.

5.2. Atividades enzimáticas e farmacológicas

5.2.1. Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica da Bpir-I-PLA₂ determinada através de titulação potenciométrica foi de $130,5 \pm 2,85$ U/mg, a qual foi abolida na presença do inibidor BPB, enquanto que a atividade da toxina PrTX-III, uma PLA₂ Asp49 básica, isolada do mesmo veneno, foi de $48,7 \pm 1,06$ U/mg, quase três vezes menor do que a isoforma ácida (Figura 12).

Figura 12. Atividade fosfolipásica das enzimas Bpir-I-PLA₂ (na presença e ausência do inibidor BPB) e PrTX-III. A solução de tampão PBS foi utilizada como controle. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

5.2.2. Caracterização enzimática

A atividade fosfolipásica foi testada pelo método de hemólise radial indireta, realizado em placas, utilizando no teste inicial, várias concentrações da enzima (0,01; 0,1; 0,5; 1; 2; 4 e 8 µg). A concentração que resultou em um halo de hemólise de 1cm, denominada dose hemolítica mínima (DHM), foi a de 0,1 µg (Figura 14A), sendo utilizada nos testes seguintes envolvendo diferentes condições de pH (2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 7,0; 8,0 e 10,0), temperatura (4; 25; 37; 45; 60 e 100°C), inibidores (EDTA (1; 15mM) e BPB (2,5; 5mM)). A atividade fosfolipásica do veneno bruto de *Bothrops pirajai* também foi avaliada. Bpir-I-PLA₂ apresentou maior atividade PLA₂ do que o veneno bruto de *B. pirajai* em todos os tempos analisados.

No teste de hidrólise de fosfolipídios fluorescentes (Figura 13B) verificou-se que o substrato NBD-PC foi o mais favorável para ação catalítica da enzima. A taxa e intensidade de hidrólise de NBD-PC foi mais rápida quando comparada com os demais fosfolipídios (NBD-PE, NBD-PA e NBD-PG). Na avaliação da dependência de íons divalentes (Ca⁺², Ba⁺², Cu⁺², Fe⁺², Mg⁺², Mn⁺², Zn⁺²) para a atividade catalítica da enzima foi encontrado que o íon cálcio é um cofator para Bpir-I-PLA₂.

A atividade fosfolipásica da Bpir-I-PLA₂ se mostrou dose-dependente (Figura 14A). A dose hemolítica mínima encontrada e utilizada nos demais testes foi de 0,1 µg. Em todos os tempos avaliados, a enzima Bpir-I-PLA₂ se mostrou mais cataliticamente ativa do que o veneno bruto de *B. pirajai*. (Figura 13A). A enzima demonstrou estabilidade mesmo quando submetida a diferentes condições de temperatura e de pH e, como ilustrado na Figura 14B e C, respectivamente. Os tratamentos com EDTA e com BPB (Figura 14D) inibiram a atividade enzimática de maneira dose-dependente. A presença do íon cálcio elevou a atividade fosfolipásica de maneira dose-dependente.

Figura 13. Atividade fosfolipásica de Bpir-I-PLA₂ e do veneno bruto de *Bothrops pirajai*. **(A)** Atividade fosfolipásica de Bpir-I-PLA₂ e do veneno bruto de *Bothrops pirajai*. Os géis foram mantidos em estufa por 3, 6, 12 e 24 horas, respectivamente. A atividade fosfolipásica foi avaliada pelo método de hemólise radial indireta, em gel contendo ágar, gema de ovo, eritrócitos bovinos, cloreto de cálcio, azida de sódio e PBS. Os géis contendo as amostras foram mantidos em estufa a 37°C. Os halos foram medidos em centímetros para a quantificação da atividade fosfolipásica. **(B)** Atividade fosfolipásica de Bpir-I-PLA₂ (15µg/mL) sobre fosfolipídios marcados fluorescentes na concentração de 5mM (NBD-PC (fosfatidilcolina), NBD-PA (ácido fosfatídico), NBD-PG (fosfatidilglicerol) e NBD-PE (fosfatidiletanolamina). **(C)** Atividade fosfolipásica de Bpir-I-PLA₂ sobre o substrato NBD-PC na presença de diferentes concentrações de íons divalentes. 1U foi considerada como a quantidade de enzima em microgramas que libera o produto em nmoles por minuto

Figura 14. Caracterização enzimática da Bpir-I-PLA₂. A atividade fosfolipásica foi avaliada pelo método de hemólise radial indireta, em gel contendo ágar, gema de ovo, eritrócitos bovinos, cloreto de cálcio, azida de sódio e PBS. Os géis contendo as amostras foram mantidos em estufa a 37°C por 12 horas. Os halos foram medidos em centímetros para a quantificação da atividade fosfolipásica. **(A)** Atividade fosfolipásica e variação da concentração enzimática; **(B)** Atividade fosfolipásica e variação de temperatura; **(C)** Atividade fosfolipásica e variação de pH **(D)** Atividade fosfolipásica e inibidores.

5.2.3. Indução de edema

Uma curva dose resposta para obtenção das concentrações mínimas capazes de induzir edema acima de 60% em 30 minutos foi obtida após a administração local de diferentes doses de PLA₂s de *B. pirajai*.

De acordo com os resultados obtidos, a toxina PrTX-III (25µg) se apresentou mais edematogênica do que a Bpir-I-PLA₂ (25µg), induzindo 91,8% de edema, enquanto que a fosfolipase A₂ ácida Bpir-I-PLA₂ induziu 58%, sendo esta indução diminuída para 33,9% após pré-incubação da enzima com BPB (Figura 15).

Figura 15. Análise do efeito edematogênico de Bpir-I-PLA₂ em camundongos. Edema induzido 30 minutos após injeção das PLA₂s via subplantar em camundongos. A porcentagem de edema foi calculada subtraindo-se de cada valor obtido os valores inicialmente aferidos no tempo 0h e os valores obtidos a partir de animais inoculados somente com PBS. Os resultados foram expressos pela média ± SD (n=5).

5.2.4. Miotoxicidade

A atividade miotóxica foi determinada pela dosagem da enzima creatina cinase (CK) no plasma de camundongos injetados com as PLA₂. A concentração de CK no plasma de animais injetados com Bpir-I-PLA₂ foi de $400,98 \pm 32,9$ U/L, valor próximo ao dos animais injetados somente com o tampão PBS ($405,98 \pm 25,6$), enquanto que os camundongos injetados com a miotoxina PrTX-III apresentaram uma elevada ($3.085,55 \pm 235,5$) dosagem de CK no seu plasma (Figura 16).

Figura 16. Análise do efeito miotóxico de fosfolipases A₂ isoladas do veneno de *B. pirajai*. Injeção de 100 µg de toxina via i.m. no gastrocnêmio direito de camundongos. O sangue foi coletado por corte na região caudal, 3 horas após a injeção. Foram utilizados 4 µL de plasma para dosagem de CK através do kit CK-NAC cinético (Bioclin). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=6).

5.2.5. Atividade anticoagulante

A atividade anticoagulante da Bpir-I-PLA₂ foi realizada de acordo com o método previamente descrito (ALVARADO e GUTIÉRREZ, 1988), utilizando plasma bovino citratado e cloreto de cálcio. O resultado expressa a quantidade de enzima capaz de tornar o plasma incoagulável, considerando o tempo mínimo de 45 minutos para tal classificação. O controle negativo foi realizado com substituição das proteínas por PBS.

Quando incubada com o plasma, a enzima Bpir-I-PLA₂ apresentou moderada atividade anticoagulante (0,18 µg de enzima/200µL de plasma), o que é revertido quando esta é pré-incubada com BPB, enquanto que a toxina PrTX-III apresentou elevada atividade anticoagulante sobre o plasma, na dose de 0,05 µg para cada 200µL de plasma.

Tabela 5. Atividade anticoagulante de Bpir-I-PLA₂ e PrTX-III.

Enzimas PLA ₂ s Asp49 Dose anticoagulante mínima (µg/200µL plasma)	
Bpir-I-PLA ₂ (ácida)	0,18
PrTX-III (básica)	0,05
Bpir-I-PLA ₂ + BPB	Não-anticoagulante
PBS	Controle negativo (coagulante)

5.2.6. Efeito da Bpir-I-PLA₂ sobre a agregação plaquetária

A Bpir-I-PLA₂ apresentou atividade inibitória dose dependente sobre a agregação plaquetária em ambos os experimentos, utilizando como indutores de agregação o ADP e o colágeno.

Os controles foram feitos usando colágeno e ADP obtendo-se 100% de agregação plaquetária. Para o teste de inibição da atividade da enzima, foi utilizado um inibidor de fosfolipases (BPP 5mM), procedendo com incubação prévia deste com a PLA₂ por 2 - 3 minutos em 37°C.

Figura 17. Inibição de agregação plaquetária induzida pela Bpir-I-PLA₂ isolada de *Bothrops pirajai* na presença de ADP (A) ou colágeno (B). A atividade da enzima foi avaliada sobre plasma rico em plaquetas (PRP). O efeito inibitório da PLA₂ na agregação plaquetária foi expresso como a diferença em percentual da resposta máxima obtida na presença da PLA₂, em comparação com o valor obtido no controle. Para o teste de inibição da atividade da enzima, foi utilizado um inibidor de fosfolipases (BPP 5mM), procedendo com incubação prévia deste com a proteína por 2 - 3 minutos em 37°C. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

5.2.7. Atividade citotóxica sobre células tumorais

A atividade citotóxica da enzima Bpir-I-PLA₂ foi avaliada pelo método do MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) conforme descrito por Mosmann (1983), que avalia as células viáveis após incubação com elemento citotóxico. Os controles negativo (célula e meio RPMI) e branco (meio RPMI) também foram mensurados (resultados não apresentados).

A fosfolipase A₂ Bpir-I-PLA₂ demonstrou atividade antitumoral sobre todas as linhagens testadas (JURKAT, SK-BR-3 e EAT) de maneira dose-dependente.

Figura 18. Atividade citotóxica induzida por Bpir-I-PLA₂ sobre linhagens de células tumorais humanas (JURKAT, SK-BR-3) e murina (EAT). Foi utilizado como controle positivo o metotrexato (MTX). A atividade citotóxica foi avaliada pelo método de MTT. As leituras foram feitas das placas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

5.2.8. Efeito sobre a pressão arterial

A pressão arterial pulsante (PAP) de ratos anestesiados com uretana diminuiu durante a administração i.v. de 25 $\mu\text{g/kg}$ de Bpir-I-PLA₂ com ausência de efeitos cardiovasculares após a injeção de proteína modificada por BPB (25 $\mu\text{g/kg}$ BPB+Bpir-I-PLA₂), indicando que a resposta hipotensora, aparentemente imediata, possa estar relacionada à atividade enzimática.

Figure 19. Atividade hipotensora de Bpir-I-PLA₂ na ausência e presença de BPB. A pressão arterial foi mensurada usando um amplificador de sinal de pressão sanguínea modelo 7450A (HP, USA) conectado a um sistema de coleta de dados computadorizados (di 190, Dataq, USA). **(A)** Atividade hipotensora de Bpir-I-PLA₂ sobre a pressão arterial. **(B)** Atividade hipotensora abolida na administração da enzima previamente modificada com BPB. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

5.2.9. Atividade microbicida e parasitica

A atividade microbicida de Bpir-I-PLA₂ foi avaliada sobre as linhagens *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Bpir-I-PLA₂ retardou o crescimento da cultura das linhagens de maneira dose-dependente quando incubada por 30 min, no entanto se mostrando menos potente do que a PrTX-III (Figura 20 A).

Em adição ao seu papel letal sobre bactérias e fungos, Bpir-I-PLA₂ foi um efetivo agente parasitica sobre culturas de células de *Leishmania amazonensis* e *L. braziliensis* (Figura 20 B).

Figura 20. Atividade microbicida e parasitica de Bpir-I-PLA₂ e PrTX-III. Em 1,0 mL de bactérias a $1,2 \times 10^6$ UFC adicionou-se meio BHI contendo Bpir-I-PLA₂ incubando a 37 °C por períodos de 30 minutos. A leitura da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada visualmente pela turvação do meio em macro-diluições. (B) Cerca de 3×10^6 parasitas foram incubadas com a Bpir-I-PLA₂ e após 30min foram pulsadas com timidina. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

5.3. Estudo estrutural da fosfolipase A₂ ácida

5.3.1. Clonagem e expressão do cDNA de Bpir-I-PLA₂

O cDNA que codifica a PLA₂ ácida Bpir-I-PLA₂ foi preparado a partir de RNA extraído da glândula de veneno da serpente *Bothrops pirajai*. A sequência completa contendo 366 pares de bases codifica um produto gênico com 122 aminoácidos a cadeia (Figura 21).

Esta sequência da PLA₂ ácida foi clonada utilizando o vetor pUC99 e expressa por meio do plasmídeo pET21a em corpos de inclusão de bactérias *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. A expressão foi eficiente como ilustrada pela presença de intensa banda protéica em SDS-PAGE após indução por IPTG (Figura 22 A). A purificação de Bpir-I-PLA₂ recombinante foi realizada em RP-HPLC demonstrando um padrão de banda bastante semelhante ao da proteína nativa.

```

aacctgtggcagtttggcaaactgattatgaaaattgcgggcgaaagcggcgtgttttaa
N L W Q F G K L I M K I A G E S G V F K
tatctgagctatggctgctattgcggcctgggcggccagggccagccgaccgatgcgacc
Y L S Y G C Y C G L G G Q G Q P T D A T
gatcgctgctgctttgtgcatgattgctgctatggcaaagtgaccggctgcgatccgaaa
D R C C F V H D C C Y G K V T G C D P K
attgatagctatacctatagcaaagaaaacggcgatgtggtgtgcgggcgcgatgatccg
I D S Y T Y S K E N G D V V C G G D D P
tgcaaaaaacagatttgcgaaatgcgatcgcgtggcgggcgacctgctttcgcgataacaaa
C K K Q I C E C D R V A A T C F R D N K
gatacctatgataattaaatattgggttttatggcgcgaaaaactgccaggaagaaagcgaa
D T Y D I K Y W F Y G A K N C Q E E S E
ccgtgc
P C

```

Figura 21. Sequência do cDNA e dedução da sequência de aminoácidos de Bpir-I-PLA₂ isolada da glândula da serpente *Bothrops pirajai*. A sequência da PLA₂ ácida madura está ilustrada. A sequência N-terminal de Bpir-I-PLA₂ foi confirmado por sequenciamento direto dos resíduos de aminoácidos (sublinhado).

Figura 22. Expressão do cDNA de Bpir-I-PLA₂. **(A)** SDS-PAGE a 12% para análise da expressão em vetor pET-21a induzida por diferentes concentrações de IPTG. 1. Padrão de peso molecular; 2. Induzido por IPTG; 3. Não induzido. **(B)** Purificação da proteína recombinante através de RP-HPLC. Estão ilustradas as curvas de amostras das proteínas nativa e recombinante de Bpir-I-PLA₂ submetidas a gradiente crescente de acetonitrila. **(C)** SDS-PAGE das proteínas nativa e recombinante. 1. Padrão de peso molecular; 2. Bpir-I-PLA₂ recombinante; 3. Bpir-I-PLA₂ nativa.

5.3.2. Modelagem protéica

O alinhamento entre as seqüências da Bpir-I-PLA₂ e das outras moléculas homólogas depositadas no banco de dados estrutural (NCBI BLAST / FASTA: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)) (PEARSON e LIPMAN, 1988) foram gerados usando servidor CLUSTAL W (HIGGINS et al., 1996) com subsequente formatação através do servidor ESPript (SELISTRE-DE-ARAÚJO E SOUZA, 2007) (Figura 23). A estrutura da BthA-I-PLA₂, uma fosfolipase A₂ ácida do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (MAGRO et al., 2004; 2005), foi selecionada e usada como molde pelo programa MODELLER 8v2 (MARTI-RENO et al., 2000) para construir o modelo inicial da Bpir-I-PLA₂, apresentado na forma RIBBON (Figura 24).

Figura 23. Múltiplo alinhamento de sequências de Bpir-I-PLA₂ e outras PLA₂s de venenos de serpentes. Os resíduos idênticos observados no múltiplo alinhamento de seqüências são representados dentro de caixas com fundo vermelho. Os resíduos similares são representados dentro de caixas com fundo branco e os resíduos não-similares, fora das caixas.

NLWQFGKLIIMKIAGESGVFKYLSYGCYCGLGGQGQPPTDATDRCCFVHDCCYGKVVTGCDPKIDSYTYSKENGDVVCGGDDP
CHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHCCHHHHHCCCCCCCCCCCCEEEECEEEECCECH
CHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHCCCCCCCCCCCCEEEECEEEECCECH
CHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHCCHHHHHCCCCCCCCCCCCEEEECEEEECCECH

CKKQICECDRVAATCFRDNKDITYDIKYWFYGAKNCCQEESPC
 HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCHHHCCCCHHHCCCCCCCCC
 HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHCCCCCCCCCCCCCCCCC
 HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCHHHCCCCHHHCCCCCCCCC

Figura 24. Modelo estrutural em três dimensões de Bpir-I-PLA₂ na forma RIBBON. O modelo foi construído utilizando as coordenadas da PLA₂ ácida BthA-I-PLA₂ (90% de identidade) como molde.

6. Discussão

6.1. Isolamento e Caracterização Bioquímica da Fosfolipase A₂ ácida do veneno de *Bothrops pirajai*

O método de isolamento de PLA₂s básicas proposto por Soares e colaboradores (1998), realizado em resina de CM-Sepharose, uma trocadora catiônica, em tampão AMBIC 0,05M pH 8,0, mostrou-se adequado para a separação das isoformas ácidas e básicas de fosfolipases A₂ presentes no veneno da serpente *Bothrops pirajai*.

No presente trabalho a purificação de Bpir-I-PLA₂ a partir do veneno total de *Bothrops pirajai* foi realizada através de isolamento por cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose, seguida de purificação da fração P-Ib com elevada atividade fosfolipásica através de HPLC de fase reversa (resina C18), em tampão acetonitrila-TFA, para eliminação de vestígios de outros componentes do veneno e obtenção da proteína em elevado grau de pureza (Figura 9C).

Vários venenos de serpentes já foram fracionados utilizando procedimentos simplificados baseados em CM-Sepharose e/ou RP-HPLC, como p. ex. os venenos de *Bothrops moojeni* (SOARES et al., 2000a; STABÉLI et al., 2006), *B. pirajai* (SOARES et al., 2001), *B. jararacussu* (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; 2002), *B. (n.) pauloensis* (RODRIGUES et al., 1998), entre outros.

Na cromatografia de troca iônica, a separação molecular é baseada na interação de moléculas carregadas presentes na fase móvel (tampão AMBIC pH 8,0) com a fase estacionária trocadora catiônica (resina de CM-Sepharose). Na presença de gradientes crescentes de concentração do tampão AMBIC (0,05M-1M), ocorre o aumento progressivo da tendência de proteínas ligadas se dissociarem da matriz de troca iônica. O conhecimento do ponto isoelétrico (pI) de uma proteína, ou seja, o valor de pH no qual a sua carga total é nula, é de grande importância neste método de separação. Dessa forma, a PLA₂ ácida de interesse é eluída nos primeiros picos, conforme ilustra a Figura 9A. Na cromatografia de fase reversa, a separação ocorre com base no caráter

hidrofóbico da proteína de interesse, a qual se liga a uma molécula hidrofóbica na fase estacionária (resina C18) e se separa dos demais componentes da mistura original, posteriormente, sendo eluída junto à fase móvel sob um gradiente decrescente de hidrofobicidade. A PLA₂ ácida, Bpir-I-PLA₂, ficou retida na coluna por até a concentração de 60% de acetonitrila.

A determinação do ponto isoelétrico de Bpir-I-PLA₂, *pI* igual a 4,9, está de acordo com a ordem de eluição da proteína em coluna trocadora de cátions associada ao tampão AMBIC pH 8,0, sendo eluídas inicialmente as moléculas carregadas negativamente em pH básico.

O perfil eletroforético em gel de poliacrilamida na presença de SDS da Bpir-I-PLA₂ (Figura 10), revelou a tendência à formação de agregados multiméricos, o que corrobora a afirmação de que as PLA₂s possuem tendência a formarem agregados (ARNI e WARD, 1996). Em condições não redutoras, a fosfolipase A₂ ácida isolada se apresenta na forma dimérica o que explica sua massa molecular relativa em torno de 28.000, entretanto, quando está reduzida com β-mercaptoetanol a PLA₂ aparece com massa molecular relativa de 14.500, demonstrando sua estrutura homodimérica (Figura 10). Os tratamentos com SDS e β-mercaptoetanol são eficientes na dissociação de agregados unidos por interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou pontes dissulfeto (WEBER e OSBORNE, 1969). Na eletroforese para proteínas ácidas sem agente desnaturante, a proteína Bpir-I-PLA₂ apresentou uma única banda sugerindo um alto grau de homogeneidade.

Nos últimos 25 anos, foram realizados estudos sobre estruturas cristalográficas que mostram estruturas monoméricas (HOLAND et al., 1990; SCOTT et al., 1992), diméricas (BRUNIE et al., 1985; ARNI et al., 1995; DE AZEVEDO et al., 1999; MARCHI-SALVADOR et al., 2006), triméricas (FREMONT et al., 1993; SINGH et al., 2005) e tetraméricas (MARCHI-SALVADOR, 2008) de PLA₂s de venenos de serpentes.

A seqüência da região N-terminal e a análise comparativa com outras PLA₂s de venenos de serpentes (Figura 11) demonstraram a presença de resíduos altamente conservados constituintes da estrutura de α-hélice característica desta região. A análise comparativa desta região demonstrou elevada similaridade entre Bpir-I-PLA₂ e, principalmente, as PLA₂s de *Bothrops*

erythromelas (BE-I-PLA₂), de *Bothrops pauloensis* (Bp-PLA₂), de *Crotalus v. viridis*, de *Crotalus atrox*, de *Agkistrodon halys pallas* e de *Naja naja*.

Resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes na porção N-terminal parecem providenciar o acesso do substrato ao sítio catalítico (ARNI e WARD, 1996). Além disso, tais resíduos poderiam ter uma grande importância estrutural se relacionando às diferentes atividades farmacológicas exercidas pelas PLA₂s.

A análise comparativa da composição de aminoácidos (Tabela 4) mostrou que não existem grandes diferenças entre as PLA₂s ácidas Bpir-I-PLA₂, a Bmoo-I-PLA₂ e a BthA-I-PLA₂. A análise da composição global de aminoácidos mostra que todas elas possuem um caráter ácido, apresentando um alto conteúdo de aminoácidos carregados negativamente (Asp, Glu), e também resíduos de aminoácidos não carregados como Gly, Leu e Tyr. A presença de 14 meia-cistíneas, sugere a presença de 7 pontes dissulfeto, característica que contribui para sua elevada estabilidade. Tais proteínas apresentam-se constituídas por aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos, concordando com descrições sobre PLA₂s realizadas por Arni e Ward (1996).

O perfil eletroforético e a composição de aminoácidos da Bpir-I-PLA₂ estão de acordo com o padrão de características de svPLA₂s, definidas como proteínas secretadas com Mr variando entre 14.000 e 18.000, estando entre as menores enzimas e contendo aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos quando em cadeia única (DENNIS, 1994; SCHALOSKE e DENNIS, 2006).

6.2. Atividades enzimáticas, farmacológicas e toxicológicas

Dentre as fosfolipases A₂ isoladas dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (aproximadamente 49) descritas até o momento (Tabela 2), 30 são proteínas básicas com pI variando entre 7 a 11, e 19 são ácidas com pI entre 4 e 5, dentre estas últimas, todas apresentam atividade catalítica (SELISTRE et al., 1990; LOMONTE et al., 1990; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; MANCUSO et al., 1995). Um grande número de PLA₂s básicas, dentre estas, algumas de *Bothrops pirajai*, tem sido purificado por métodos bioquímicos convencionais, e caracterizado, estrutural e funcionalmente. Em 1995, Mancuso e colaboradores

reportaram o isolamento, a caracterização química e funcionais parciais da piratoxina-I, uma PLA₂ Lys49 básica (pI 8,9) a partir do veneno de *B. pirajai*. Toyama et al. (1995 e 1999) descreveram as seqüências de aminoácidos das PLA₂s Lys49 básicas, piratoxina-I e -II (pI 9,0), e da PLA₂ Asp49 básica, piratoxina-III (pI 8,5) do mesmo veneno. Em 2001, Soares e colaboradores contribuíram com estes estudos analisando a relação estrutura-função das piratoxinas-I e -III. No entanto, devido à baixa concentração nos venenos, pouco se conhece sobre o mecanismo de ação das PLA₂s ácidas em geral, altamente catalíticas e indutoras de relevantes efeitos farmacológicos. Estas proteínas se constituem importantes modelos no estudo da relação estrutura-função entre fosfolipases A₂ tóxicas e não tóxicas dos venenos de serpentes contribuindo para a elucidação estrutural dos determinantes de toxicidade.

Embora as isoformas ácidas apresentem-se mais potentes cataliticamente do que as básicas, as propriedades farmacológicas das PLA₂s podem não estar completamente relacionadas com o seu ponto isoelétrico (CONDREA et al., 1983).

No presente trabalho, a atividade PLA₂ foi determinada por titulação potenciométrica, um método direto que utiliza como substrato uma emulsão aquosa de gema de ovo na presença de deoxicolato de sódio e cálcio (MANCUSO et al., 1995). A PLA₂ ácida de *B. pirajai* apresentou elevada atividade enzimática (Figura 11) quando comparada com a piratoxina-III (PrTX-III), uma PLA₂ Asp49 básica do mesmo veneno. O processo de alquilação do resíduo de His48 através da pré-incubação da Bpir-I-PLA₂ com BPB aboliu completamente tal atividade. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com estudos anteriores envolvendo PLA₂s de venenos de serpentes, nos quais as PLA₂s Asp49 ácidas são cataliticamente mais ativas do que suas isoformas básicas. Além disso, a neutralização da atividade enzimática após alquilação do resíduo de His48 por BPB comprova a participação deste resíduo na catálise enzimática da PLA₂ em estudo (ROSENBERG et al., 1983; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; CHIOATO e WARD, 2003).

A estabilidade estrutural e funcional de fosfolipases A₂ depende essencialmente de fatores como pH, temperatura e cofatores. Desta forma, para avaliar a estabilidade enzimática de Bpir-I-PLA₂, a enzima foi caracterizada através do teste de atividade fosfolipásica utilizando o método de

hemólise radial indireta, sob diferentes condições de temperatura, de pH, de concentração enzimática, de íons e de inibidores. A atividade PLA₂ da Bpir-I-PLA₂ se mostrou dose-dependente, e a enzima permaneceu estável mesmo quando submetida a diferentes temperaturas e pHs. Bpir-I-PLA₂ apresentou maior atividade PLA₂ do que o veneno bruto de *B. pirajai*, devido a maior concentração enzimática relativa em solução do que no veneno bruto.

A presença do íon cálcio aumentou a atividade PLA₂ de maneira dose dependente, diferentemente dos outros íons divalentes testados. O íon cálcio é um cofator essencial para catálise, e sua substituição por outros íons divalentes resulta em significativa redução da atividade enzimática (YU et al., 1993). Além disso, os tratamentos com EDTA (agente quelante de metais) e com BPB (inibidor de PLA₂s) inibiram a atividade fosfolipásica da proteína. As fosfolipases A₂s dependentes de metal são fortemente inibidas por agentes quelantes, como o EDTA (KINI e EVANS, 1988). Na ausência de cálcio, uma molécula de água ocupa a posição do íon e, a cadeia lateral do resíduo Asp49 e o *loop* ligante de cálcio adotam diferentes conformações, comprometendo a atividade enzimática (MURAKAMI et al., 2006).

Dessa forma, os resultados obtidos estão de acordo com as características de PLA₂s que incluem elevada estabilidade, devido a grande quantidade de pontes dissulfeto intracadeia, e a necessidade de cálcio como cofator para a atividade enzimática.

A miotoxicidade da Bpir-I-PLA₂ foi avaliada através dos níveis de atividade da creatina cinase (CK) plasmática de animais injetados. A creatina cinase é uma enzima do metabolismo energético muscular que em casos de lesão celular é liberada e pode ser detectada no plasma, como um marcador. A Bpir-I-PLA₂, não induziu aumento de atividade de CK (Figura 15), se mostrando não miotóxica, corroborando com resultados anteriores nos quais PLA₂s ácidas, apesar de altamente catalíticas, não apresentam toxicidade experimental (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; ROBERTO et al., 2004; MODESTO et al., 2006), dissociando a atividade catalítica da miotóxica.

A maioria das PLA₂s miotóxicas isoladas do veneno de *Bothrops*, descritas até então, são proteínas básicas com *pI* variando entre 7 e 10 (SELISTRE et al., 1990; LOMONTE et al., 1990; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; MANCUSO et al., 1995). A ação miotóxica de PLA₂s presentes em

venenos de serpentes ocorre através da sua interação com a membrana sarcoplasmática o que acarreta uma desorganização dos componentes fosfolipídicos, permitindo a saída de moléculas intracelulares como a creatina e a creatina cinase (GUTIÉRREZ et al., 1989). As miotoxinas podem ou não apresentar atividade catalítica, ou seja, serem capazes de hidrolisar fosfolipídios. Sendo assim, o mecanismo de ação envolvido na miotoxicidade parece estar dissociado da capacidade de catálise das PLA₂s.

Vários grupos de pesquisa, através de métodos laboratoriais e até mesmo teóricos, propõem diversas hipóteses buscando sítios farmacológicos específicos nestas enzimas. Uma região rica em resíduos de aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos junto à porção C-terminal de PLA₂s miotóxicas parece estar envolvida com a lesão da célula muscular (KINI e EVANS, 1989; DÍAZ et al., 1994). Um segmento também catiônico e hidrofóbico (resíduos 115 a 129) foi identificado em PLA₂s Lys49 como ligante de heparina na membrana celular e responsável pelo efeito miotóxico. Propondo que uma região positivamente carregada na superfície de enzimas miotóxicas poderia constituir um sítio miotóxico (CHIOATO e WARD, 2003).

Dessa forma, resíduos de aminoácidos comuns entre as PLA₂s básicas e ausentes nas PLA₂s ácidas parecem estar envolvidos com esta atividade. Assim, a ausência de miotoxicidade apresentada pela Bpir-I-PLA₂ pode estar relacionada à ausência destes resíduos.

A hemostasia, incluindo os fenômenos de agregação plaquetária, de vasoconstrição e de coagulação do sangue, é um mecanismo de controle da perda de sangue quando vasos sanguíneos são lesados. Um grande número de substâncias que afetam o sistema hemostático está presente nos venenos de serpentes Viperidae, incluindo proteínas anticoagulantes, procoagulantes, fibrino(geno)líticas, as que atuam sobre a parede de vasos sanguíneos, e as que interferem na agregação plaquetária, dessa forma, exercendo um efeito difuso sobre o sistema cardiovascular (MARKLAND, 1998; DU et al., 2006).

A PLA₂ ácida de *Bothrops pirajai* isolada neste trabalho apresentou atividade anticoagulante, inibitória da agregação plaquetária e hipotensora.

A Bpir-I-PLA₂ apresentou moderada atividade anticoagulante (Tabela 5), a qual é inibida após modificação química com BPB. Enquanto, a toxina PrTX-III apresentou elevada atividade anticoagulante sobre o plasma, conforme

verificado no trabalho de Soares e colaboradores (2001), no qual a alquilação por BPB também inibiu esta atividade. Outros experimentos envolvendo estudos de modificação química das PLA₂s com BPB também demonstraram o efeito inibitório do composto na atividade anticoagulante de PLA₂s de venenos de serpentes: *Naja naja atra*, *Naja nigricolis*, *Vipera berus*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops pirajai* (VERHEIJ et al., 1980; CONDREA et al., 1983; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; SOARES et al., 2001).

Os mecanismos envolvidos na inibição do processo de coagulação do sangue pelas PLA₂s ainda estão sendo pouco investigados. Em geral, as PLA₂ fortemente anticoagulantes possuem ponto isoelétrico elevado (≥ 9) e vários estudos de seqüenciamento de aminoácidos, modificações químicas e mutagênese sítio dirigida sugerem uma região positivamente carregada, nestas PLA₂s, entre os resíduos de Lys54 e Lys77, como um sítio farmacológico relacionado à atividade destas proteínas. A característica capacidade das PLA₂s de se ligarem e de clivar fosfolipídios de membrana sugere que estas também possam inibir a coagulação do sangue através da destruição de fosfolipídios procoagulantes. Além disso, os efeitos anticoagulantes destas PLA₂s também podem estar associados à competição destas proteínas com fatores coagulantes pela ligação a fosfolipídios envolvidos no processo de coagulação (VERHEIJ et al., 1980; KINI e EVANS, 1989, 2003; CHIOATO e WARD, 2003).

Dessa forma, o mecanismo de ação de Bpir-I-PLA₂, uma PLA₂ ácida com moderada ação anticoagulante, parece estar associada a sua elevada atividade catalítica (ou sua forte interação) sobre fosfolipídios pró-coagulantes.

As plaquetas desempenham um papel essencial no sistema hemostático, pois além de participarem da formação de trombos decorrentes da lesão de vasos sanguíneos, contribuem com seus receptores de membrana que facilitam e amplificam a atividade localizada dos fatores da coagulação sanguínea (RUGGERI e MENDOLICCHIO, 2007). As funções plaquetárias podem ser avaliadas através de testes *in vitro* de agregação plaquetária. Várias proteínas presentes em venenos de serpentes, como fosfolipases A₂, desintegrinas, serinoproteases e lectinas do tipo C, modulam seletivamente a adesão ou ativação plaquetária por meio de um efeito específico em receptores

e seus ligantes (ZINGALI et al., 1993; SERRANO et al., 1995; FULY et al., 1997; COELHO et al., 1999).

De acordo com os efeitos sobre plaquetas, as PLA₂s podem ser classificadas em três tipos: classe A: algumas PLA₂s induzem agregação plaquetária por clivarem fosfolipídios presentes na membrana de plaquetas, liberando ácido araquidônico e formando seus metabólitos, por exemplo o tromboxano A₂; classe B: outras PLA₂s inibem a agregação plaquetária por clivarem estes subprodutos do ácido araquidônico; classe C: além disso, existem PLA₂s que induzem resposta bifásica, efeito pro-agregante em baixas concentrações ou em tempos curtos de incubação e um efeito anti-agregante, em altas concentrações ou em longos períodos de incubação (FULY et al., 1997). Os efeitos sobre plaquetas podem também ser independentes da catálise pelas PLA₂s. Uma fosfolipase A₂ potente inibidora da agregação plaquetária, isolada da serpente *Ophiophagus hannah*, é parcialmente dependente da atividade enzimática, sendo o efeito anti-plaquetário mediado também por uma mudança no citoesqueleto plaquetário relacionada a um sítio alostérico localizado no *loop* pancreático da enzima (HUANG et al., 1997). Wang e colaboradores (1996) sugerem a participação dos resíduos Phe20, Trp21 (curta hélice) e Phe113, Trp119 (C-terminal) de PLA₂s no processo de inibição da agregação plaquetária.

A Bpir-I-PLA₂ também induziu inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) (Figura 16) de maneira dose dependente, promovida por ADP ou colágeno, perdendo a atividade após modificação química com BPB. Outros estudos envolvendo PLA₂s ácidas, a BE-I-PLA₂, isolada de *Bothrops erythromelas*, a TJ-PLA₂, de *Trimeresurus jerdonii* e a BthA-I-PLA₂ de *B. jararacussu* também demonstram o efeito inibitório sobre a agregação plaquetária (LU et al., 2002; ROBERTO et al., 2004; DE ALBUQUERQUE MODESTO et al., 2006). O mecanismo de ação de Bpir-I-PLA₂ parece envolver a clivagem subprodutos do ácido araquidônico, responsáveis pela agregação de plaquetas. Dessa forma, de acordo com a classificação acima, Bpir-I-PLA₂ pode pertence à classe B, entretanto a participação de sítios farmacológicos não deve ser descartada.

Bpir-I-PLA₂ apresentou efeito sobre a pressão arterial em ratos, induzindo hipotensão. Tal atividade foi completamente abolida na presença de

BPB. Até o momento não há nenhuma informação estrutural, sugerindo a existência de sítios farmacológicos nas fosfolipases A₂ responsáveis pelo efeito hipotensor destas enzimas. Segundo Huang e Lee (1984) a atividade hipotensora de PLA₂s deve estar relacionada à síntese de prostaglandinas a partir da molécula de ácido araquidônico (AA) liberada como produto da atividade catalítica fosfolipásica. Estas prostaglandinas atuam no sistema renina-angiotensina, um conjunto de moléculas protéicas envolvido no controle do volume do líquido extracelular e da pressão arterial. Além disso, os leucotrienos, derivados também do AA pela ação da lipoxigenase, poderiam participar atuando sobre a musculatura lisa dos vasos sanguíneos.

Deste modo, a elevada atividade enzimática de Bpir-I-PLA₂ poderia contribuir para liberação de substâncias vasoativas desencadeadoras da ação hipotensora.

Um grande número de PLA₂ isoladas de venenos de serpentes possui atividade bactericida. A atividade microbicida de Bpir-I-PLA₂ foi avaliada sobre as linhagens *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Bpir-I-PLA₂ retardou o crescimento da cultura das linhagens de maneira dose-dependente quando incubada por 30 min, no entanto se mostrando menos potente do que a PrTX-III. Em adição ao seu papel letal sobre bactérias e fungos, Bpir-I-PLA₂ foi um efetivo agente parasiticida sobre culturas de células de *Leishmania amazonensis* e *L. braziliensis*.

O mecanismo de ação envolvido no efeito citotóxico sobre bactérias, fungos e parasitas ainda é pouco investigado. A toxicidade das miotoxinas I e II de *Bothrops asper* sobre bactérias parece envolver a perturbação da membrana celular através de resíduos de aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos na região C-terminal da proteína (NEVALAINEN et al., 2008). Testes adicionais são necessários para o estudo do mecanismo de ação de Bpir-I-PLA₂ sobre microorganismos e parasitas.

A inflamação local é uma característica do envenenamento por serpentes das subfamílias Viperinae e Crotalinae (DENNIS, 1994). O edema local induzido por venenos de serpentes do gênero *Bothrops* parece ser mediado por substâncias vasoativas, como histamina e serotonina, além de prostaglandinas e quininas (GUTIÉRREZ et al., 1986). A degranulação de mastócitos e conseqüente liberação de serotonina parecem ser os passos

iniciais na formação de edema nas patas de camundongos injetados com venenos de serpentes. Além disso, substâncias lipídicas liberadas a partir da atividade catalítica de PLA₂s serviriam como precursores de mediadores pro-inflamatórios envolvidos no processo edematogênico. Entretanto, a não inativação total da atividade edematogênica após tratamento da PLA₂ com BPB sugere a existência de outras ações não enzimáticas relacionadas ao efeito (CIRINO et al., 1989).

A administração de 25µg de Bpir-I-PLA₂ via intradérmica subplantar foi capaz de induzir edema de 58%, e esta indução foi diminuída para 33,9% após pré-incubação da enzima com BPB, enquanto que a mesma quantidade de PrTX-III induziu 91,8% de edema. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados anteriormente com PLA₂s ácidas de *B. jararacussu* no qual a modificação química com BPB elimina as atividades enzimática, anticoagulante e antiplaquetária, não inibindo completamente a formação de edema (KETELHUT et al., 2003), indicando que além do sítio catalítico, sítos farmacológicos específicos parecem estar envolvidos com esta atividade.

A Bpir-I-PLA₂ apresentou atividade citotóxica sobre diferentes linhagens de células tumorais, sendo seu maior efeito observado sobre as linhagens de células de leucemia linfoblástica T humana (JURKAT) e células de tumor ascítico murino de Ehrlich (EAT). Alguns trabalhos propõem que PLA₂ possuem um papel na mediação de apoptose em vários modelos, incluindo linhagens de células tumorais (CUMMINGS et al., 2000). A atividade PLA₂ parece acelerar o metabolismo fosfolipídico influenciando alterações na membrana que ocorrerem durante a apoptose (PANINI et al., 2001).

O mecanismo de ação citotóxica da PLA₂ ácida isolada do veneno de *B. pirajai* sobre células tumorais pode envolver sua elevada atividade catalítica e conseqüente indução de apoptose.

As PLA₂s Asp49 de venenos de serpentes são proteínas extremamente interessantes justamente por apresentarem diversas atividades biológicas não relacionadas ao mecanismo catalítico típico destas enzimas. Kini e Evans (1989) propuseram um modelo de ação para as PLA₂s no qual sítos farmacológicos específicos, situados em diferentes partes destas enzimas, interagem com sítos-alvo nos tecidos interferindo em diversos processos fisiológicos. Entretanto, apesar do grande número de estudos na área, pouco é

conhecido em termos estruturais a respeito da localização precisa destes sítios. O forte efeito anticoagulante de algumas PLA₂s Asp49 foi associado a uma região positivamente carregada entre os resíduos de Lys54 e Lys77 (KINI e EVANS, 1989, 2003; CHIOATO e WARD, 2003) e a miotoxicidade de PLA₂s Lys49 parece estar relacionada a um segmento catiônico e hidrofóbico (resíduos 115 a 129) presente na região C-terminal destas enzimas (CHIOATO e WARD, 2003). Entretanto, em relação às demais atividades biológicas relacionadas às PLA₂s, dentre elas as atividades hipotensora e de inibição de agregação plaquetária, nenhuma informação estrutural é conhecida.

A alquilação do resíduo de His48, altamente conservado, utilizando brometo de *p*-bromofenacila (BPB) induz a perda de atividade enzimática e redução dos efeitos tóxicos e farmacológicos das fosfolipases A₂ (SOARES e GIGLIO, 2003). Estudos de modificação química por BPB da piratoxina-III (PrTX-III) realizados por Soares e colaboradores (2001) demonstraram a inibição das atividades enzimática, anticoagulante, miotóxica, citotóxica e edematogênica quando comparadas com a enzima na forma nativa. Em estudos anteriores, a modificação do resíduo His48 de PLA₂s Asp49 ácidas de *Bothrops jararacussu* (BthA-I-PLA₂ e SIIISPIIB), de *Bothrops jararaca* (Bj-PLA₂) e de *Bothrops pauloensis* (Bp-PLA₂) inibiu quase completamente as atividades catalíticas e inibidora da agregação plaquetária, dentre outras específicas para cada caso (SERRANO et al., 1999; KETELHUT et al., 2003; ROBERTO et al., 2004; RODRIGUES et al., 2007). Conforme foi observado na realização dos ensaios biológicos, a alquilação por BPB da Bpir-I-PLA₂ inibiu estas duas atividades, como também as atividades anticoagulante, hipotensora e edematogênica apresentadas pela enzima nativa.

O BPB consiste em um reagente que alquila especificamente o resíduo de histidina presente no sítio ativo de fosfolipases A₂ promovendo a inibição da atividade enzimática por ligação covalente à His48 da proteína. Em PLA₂s Asp49, cataliticamente ativas, nas quais esta modificação promove a inibição das atividades farmacológicas, sugere-se que os efeitos biológicos podem estar associados com a atividade catalítica. Entretanto, considerando uma possível mudança conformacional induzida pelo tratamento das PLA₂s com BPB, capaz de afetar outras regiões da molécula responsáveis pelos efeitos farmacológicos, alguns trabalhos envolvendo a análise estrutural destas

enzimas vem sendo realizados. Nenhuma mudança conformacional foi observada na alquilação envolvendo a PLA₂ ácida de *Agkistrodon halys*, com exceção das modificações do sítio catalítico onde o resíduo de His48 está covalentemente ligado ao BPB (ZHAO et al., 1998). Entretanto, sugere-se que a presença do íon Na⁺ no *loop* ligante de cálcio poderia impedir eventuais alterações estruturais provocadas pela alquilação por BPB (MAGRO, 2006).

Por outro lado, alterações significativas no *loop* ligante de cálcio, na β -wing e na C-terminal, regiões relacionadas a diversas atividades farmacológicas, foram encontradas na análise estrutural da BthA-I-PLA₂ de *Bothrops jararacussu*, complexada com BPB, realizada por Magro (2006) que sugeriu que a ligação com BPB parece inibir indiretamente as atividades anticoagulante, inibitória da agregação plaquetária e hipotensora de PLA₂s, indicando que o mecanismo de ação da fosfolipase A₂ parece envolver os sítios farmacológicos, e não somente a atividade catalítica intrínseca da proteína. Adicionalmente, Marchi-Salvador (2008), realizando a elucidação estrutural da PLA₂ Lys49 (desprovida de atividade catalítica) modificada por BPB, PrTX-I-BPB, de *Bothrops pirajai*, demonstrou uma alteração conformacional na região C-terminal (resíduos 115-133), e sugeriu que a redução das atividades miotóxica, citotóxica e edematogênica gerada pela modificação por BPB da His48 poderia ser atribuída à alteração observada na região C-terminal, referida como responsável por estas atividades.

Dessa forma, a caracterização proteômica e, mais especificamente, novos estudos estruturais, são necessários para o entendimento do mecanismo de inativação catalítico, tão bem como a inibição de efeitos tóxicos e farmacológicos por ação do BPB. Tais estudos auxiliariam no entendimento dos mecanismos farmacológicos de PLA₂s, e poderiam ser de extrema utilidade para a elaboração de novos fármacos com ação em diferentes processos fisiopatológicos.

6.3. Caracterização Estrutural da fosfolipase A₂

O múltiplo alinhamento entre as estruturas primárias de Bpir-I-PLA₂, obtida por sequenciamento do seu cDNA, e estruturas das outras moléculas homólogas, depositadas no banco de dados estrutural (NCBI BLAST / FASTA: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)) (PEARSON e LIPMAN, 1988) foram gerados

usando servidor CLUSTAL W, e mostrou elevada similaridade estrutural entre as PLA₂s de venenos de serpentes. Todas estas proteínas apresentam regiões conservadas características das PLA₂s, incluindo os resíduos do sítio catalítico (D₄₂RCCFVHD₄₉), a região N-terminal (12 resíduos iniciais) e o sítio ligante de cálcio (C₂₇XCGXGG₃₃).

Comparando a estrutura primária de Bpir-I-PLA₂ e da PrTX-III, várias substituições de resíduos de aminoácidos foram encontradas, incluindo: Q34↔R34, G53↔K53, I105↔K105, F109↔R109, G111↔H111, Q117↔K117, E118↔K118 e E120↔K120. As mudanças observadas podem estar relacionadas às diferenças no ponto isoelétrico das proteínas e também às diferenças nas atividades biológicas destas toxinas, dentre elas miotoxicidade e atividade anticoagulante. A piratoxina-III é uma Asp49 básica, com elevada atividade miotóxica e anticoagulante. A miotoxicidade parece estar relacionada à presença de alguns sítios catiônicos presentes na região C-terminal (resíduos 108 em diante) (DÍAZ et al., 1994). A forte ação inibitória sobre a coagulação do plasma parece envolver a presença de uma região positivamente carregada entre os resíduos Lys54 e Lys57 da PLA₂.

Confirmando o estudo de homologia entre os resíduos da região N-terminal, outras PLA₂s ácidas de serpentes analisadas apresentaram também elevada similaridade na análise da sua estrutura primária com a da Bpir-I-PLA₂: BinTX-I : 85% (*Bothrops insularis*), BJ-PLA₂ : 79% (*Bothrops jararaca*), BE-I-PLA₂ : 82% (*Bothrops erythromelas*), BthA-I-PLA₂ : 90% (*Bothrops jararacussu*), PLA₂ : 71% (*Crotalus v. viridis*), PLA₂ : 68% (*Crotalus atrox*) e PLA₂ : 75% (*A. halys pallas*). Alguns resíduos se mostram totalmente conservados, como por exemplo a Y21, G30, K54 e P60.

Dessa forma, as fosfolipases A₂s Asp49 ácidas consistem em uma classe moderadamente conservada de enzimas, dependendo da espécie de serpente, com elevada atividade catalítica e relevantes efeitos farmacológicos associados a uma baixa toxicidade.

Os estudos moleculares proporcionam vias alternativas de produção em maior quantidade da proteína clonada, a qual representa apenas cerca de 2-3% do veneno total, auxiliando também na manutenção da integridade do meio ambiente, considerando a condição de estado de risco de extinção em que a espécie *Bothrops pirajai* se encontra. Estes estudos também permitem

compreender o mecanismo de ação e a função biológica destes compostos, uma vez que estes assumem estruturas tridimensionais constituídas por diferentes domínios funcionais.

Para isso, foram utilizadas ferramentas de biologia molecular e modelagem molecular. A clonagem do cDNA isolado da glândula de veneno de *Bothrops pirajai*, resultou em um gene, denominado BPIR-A, com comprimento total de 366 pares de bases que codificam uma proteína de 122 resíduos de aminoácidos. A expressão heteróloga de BPIR-A foi realizada em *E. coli*, como corpos de inclusão, seguida de renaturação da proteína a sua estrutura nativa, conforme já observado em vários trabalhos (CHANG e CHANG 1996; WARD et al., 2001 e YANG et al., 2003; ROBERTO et al., 2004). A proteína recombinante demonstrou a mesma sequência de aminoácidos, estrutura secundária, atividade fosfolipásica e efeito inibitório sobre plaquetas (resultados não apresentados), observados para a proteína nativa Bpir-I-PLA₂, sugerindo que a recPLA₂ foi eficientemente expressa e purificada.

Futuros estudos farmacológicos e estruturais poderão auxiliar na confirmação de hipóteses baseadas na relação estrutura-função das PLA₂s, e fornecer, também, informações relevantes para o desenvolvimento de drogas e produtos biotecnológicos utilizados na pesquisa biomédica.

7. Considerações finais

A fauna e a flora têm sido fonte de diversos produtos medicinais por milhares de anos, entre os quais os venenos de serpentes se constituem em uma rica fonte de moléculas bioativas, como peptídeos, proteínas e enzimas com importantes atividades farmacológicas.

As fosfolipases A_2 isoladas de venenos de serpentes exibem significantes similaridades em sua estrutura tridimensional, embora demonstrem diferentes propriedades farmacológicas o que torna intrigantes os mecanismos de ação e a sua relação estrutura-função. Os estudos destas proteínas tornam-se importantes fontes de descoberta de novos compostos de elevado potencial biotecnológico e de modelos moleculares de interesse médico-científico. Além disso, se constituem em valiosas ferramentas biológicas para o estudo de diferentes processos fisiológicos e de intoxicação.

Com elevada atividade fosfolipásica e relevantes efeitos farmacológicos, característico de isoformas ácidas, Bpir-I-PLA₂ não é miotóxica e é moderadamente edematogênica. Entretanto atua em vários pontos da hemostasia, sendo capaz de induzir efeito inibitório sobre a agregação plaquetária, retardar o tempo de coagulação do plasma e adicionalmente induzir efeito hipotensor, antitumoral, bactericida e anti-leishmania. Devido à baixa toxicidade demonstrada, a Bpir-I-PLA₂ torna-se uma ferramenta importante nos estudos das desordens da hemostasia, como também um potencial modelo para a elaboração de novos fármacos para uso na clínica-médica.

8. Referências*

_____. SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA (SBH). Lista Brasileira de Anfíbios e Répteis. Disponível em :<<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Acesso em: 15 fev 2009.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação atual do Ofidismo 2005. **Portal Saúde**. Disponível: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2007.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - **FUNASA**. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª Ed. Brasília, 2001.

_____. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.html>>. Acesso em: 23 jan. 2008.

ALVARADO, J.; GUTIÉRREZ, J.M. anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A_2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae). **Rev Biol Trop**, v. 36, p. 563-5, 1988.

AMBROSIO, A. L. B.; NONATO, M.C.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.S.; ARNI, R.; WARD, R.J.; OWNBY, C.L.; DE SOUZA, D.H.F.; GARRATT, R.C. A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A_2 activity based on ligand-induced conformational change. **J Biol Chem**, v. 280, n. 8, p. 7326–35, 2005.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANGULO, Y.; DIAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Myotoxic phospholipases A_2 in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, p. 755–763, 2000.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; FULY, A.L.; CORRÊA, F.M.A.; ROSA, J.A.; GREENE, L.J.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A_2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochem Pharmacol**, v.64, p.723-32, 2002.

* Associação Brasileira de Normas Técnicas /NBR 6023, Rio de Janeiro, 2002.

ANGULO, Y.; CHAVES, 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) schlegelii* from Costa Rica. **Arch Biochem Biophys**, v. 339, p. 260–6, 1997.

ANGULO, Y.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; POSSANI, L.D.; LOMONTE, B. Isolation and characterization of myotoxin-II from *Atropoides (Bothrops) nummifer* snake venom, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 32, p. 63-71, 2000.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂--a structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827-41, 1996.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Crystallization and preliminary diffraction data of bothropstoxin I isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v.33, p. 383-6, 1995.

BALSINDE, J.; BALBOA, M. A.; INSEL, P. A.; DENNIS, E. A. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 39, p. 175-89, 1999.

BARBOSA, P.S.F.; MARTINS, A.M.C.; HAVT, A.; TOYAMA, D.O.; EVANGELISTA, J.S.A.M.; FERREIRA, D.P.P.; JOAZEIRO, P.P.; BERIAM, L.O.S.; TOYAMA, M.H.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin-I and -II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 376-86, 2005.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol Ther**, v.62, p.325-72, 1994.

BRUSÉS, J. L.; CAPASO, J.; KATZ, E.; PILAR, G. Specific *in vitro* biological activity of snake venom myotoxins. **J Neurochem**, v. 60, p. 1030-42, 1993.

BRUNIE, S., BOLIN, J. GEWIRTH, D.; SIGLER, P. B. The refined crystal structure of dimeric phospholipase A₂ at 2.5 Å. Access to a shielded catalytic center. **J Biol Chem**, v. 260, p. 9742-49, 1985.

CALVETE, J.J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J Mass Spectrom**, v. 42, p. 1405-14, 2007.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MALAQUE, C.M.S.; HADDAD, J.V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Editora Sarvier, 2003.

CHANG, L.S., WU, P.F., CHANG, C.C. Expression of Taiwan banded krait phospholipase A₂ in *Escherichia coli*, a fully active enzyme generated by hydrolyzing with aminopeptidase. **Biochem Bio-phys Res Commun**, v. 225 p.990-6, 1996.

CHIOATO, L.; R. J. WARD. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon**, v.42, p.869-83, 2003.

CHIPPAUX, J.P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v. 36, p. 823-46, 1997.

CIRINO, G.; PEERS, S. H.; WALLACE, J. L.; FLOWER, R.J. A study of phospholipase A₂-induced oedema in rat paw. **Eur J Pharmacol**, v. 166, p. 505-10, 1989.

COELHO, A.L.J.; DE FREITAS, M.S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; MOURA-NETO, V.; ZINGALI, R.B.; BARJA-FIDALGO, C. Effects of jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. **Exp Cell Res**, v. 251, p. 379-87, 1999.

COGO J.C.; LILLA, S.; SOUZA, G.H.M.F.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochimie**, v. 88, p. 1947-59, 2006.

CONDREA, E.; RAPUANO, B.E.; SOONS, K.R.; YANG, C.C.; ROSENBERG, P. Effect of methylation of histidine-48 on some enzymatic and pharmacological activities of snake venom phospholipases A₂. **Life Sciences**, v. 32, p. 1455-61, 1983.

COSTA, P.D.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; CRUZ-HÖFLING, M.A. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. **Toxicon**, v. 37, p. 1143-53, 1999.

COSTA, T.R.; MENALDO, D.L.; OLIVEIRA, C.Z.; SANTOS-FILHO, N.A.; TEIXEIRA, S.S.; NOMIZO, A.; FULY, A.L.; MONTEIRO, M.C.; SOUZA, B.M.; PALMA, M.S.; STÁBELI, R.G.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. Myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, p. 1645-56, 2008.

CUMMINGS, B. S., MCHOWAT, J. G., e SCHNELLMANN, R. G. Phospholipase A₂ in cell Injury and death. **J Pharmacol Exp Ther**, v.294, p. 793-9, 2000.

DANIELE, J. J.; BIANCO, I.D.; FIDELIO, G.D. Kinetic and pharmacological characterization of phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedii* venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 318, p. 65-70, 1995.

DANIELE, J. J.; BIANCO, L.D.; DELGADO, C.; BRIONES CARRILLO, D.; FIDELIO, G.D. A new phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedii* (yarará chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**, v. 35, p. 1205-15, 1997.

DAVIDSON, F.F.; DENNIS, E.A. Amino acid sequence and circular dichroism of Indian cobra (*Naja naja naja*) venom acidic phospholipase A₂. **Biochim Biophys Acta**, v. 1037, p. 7-15, 1990.

DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. **Ann N Y Acad Sci**, v. 28, p. 404-427, 1964.

DE ALBUQUERQUE MODESTO, J.C.; SPENCER, P.J.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R.C.; OLIVA, M.L.V.; DA SILVA, M.B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; GUARNIERI, M.C. BE-I-PLA₂, a novel acidic phospholipase A₂ from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I₂ release by endothelial cells. **Biochem Pharmacol**, v. 72, p. 377-84, 2006.

DE AZEVEDO JR, W.F.; WARD, R.J.; CANDURI, F.; SOARES, A.; GIGLIO, J.R.; ARNI, R.K. Crystal structure of piratoxin-I: a calcium-independent, myotoxic phospholipase A₂-homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Toxicon**, v. 36, p. 1395-1406, 1998.

DE AZEVEDO Jr, W.F.; WARD, R.J.; CANDURI, F.; SOARES, A.M. ; GIGLIO, J.R.; ARNI, R.K. Structure of a Lys49-Phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Bothrops nummifer* (jumping viper). **Toxicon**, v. 37, p. 371-84, 1999.

DE HASS, G.H.; POSTEMA, N.M.; NNIEUWENHUIZEN, W.; VAN DEENEN, L.L.M. Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. **Biochem Biophys Acta**, v. 159, p. 103-117, 1968.

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

DE OLIVEIRA, T.; DE AMORIM, H. L. N.; GUIMARÃES, J.A. Interfacial activation of snake venom phospholipases A₂ (svPLA₂) probed by molecular dynamics simulations. **J Mol Struct: Theochem**, v. 818, p. 31–41, 2007.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J Biol Chem**, v. 269, p. 13057-60, 1994.

DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Isolation and characterization of basic myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 298, n. 1, p. 135-42, 1992.

DÍAZ, C.; ALAPE, A.; LOMONTE, B.; OLAMENDI, T.; GUTIÉRREZ, J.M. Cleavage of the NH₂-terminal octapeptide of *Bothrops asper* myotoxin Lysine-49 phospholipase A₂ reduces its membrane destabilizing effect. **Arch Biochem Biophys**, v. 312, p. 336-9, 1994.

DÍAZ, C.; LOMONTE-VIGLIOTTI, B.; ZAMUDIO, F.; GUTIÉRREZ, J.M. Purification and characterization of myotoxin-IV, a phospholipase A₂ variant, from *Bothrops asper* snake venom. **Nat Toxins**, v. 3, p. 26-31, 1995.

DIÁZ-OREIRO, C.; GUTIÉRREZ, J.M. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipase A₂ isolated from *B. asper* and *B. godmani* snake venoms: effect on enzymatic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 35, p. 241-52, 1997.

DU, X. Y.; SIM, D.S.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. Blood cells as targets of snake toxins. **Blood Cells Mol Dis**, v.36, p. 414-21, 2006.

DUNCAN, C.J. Role of intracellular calcium in promoting muscle damage: a strategy for controlling the dystrophic condition. **Experientia**, v.34, p. 1531-5, 1978.

DUPUREUR, C.M.; YU, B.Z.; MAMONE, J.A.; JAIN, M.K.; TSAI, M.D. Phospholipase A₂ engineering. Structural and functional roles of aromaticity and hydrophobicity in the conserved phenylalanine-22 and phenylalanine-106 aromatic sandwich. **Biochemistry**, v. 31, p. 10576-83, 1992.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivates currently involved in therapeutic or diagnostic applications. **Curr Pharm Des**, v. 13, p. 2927-34, 2008.

FREMONT, D.H.; ANDERSON, D.H.; WILSON, I.A.; DENNIS, E.A.; XUONG, N.H. Crystal structure of phospholipase A₂ from Indian cobra reveals a trimeric association. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, p. 342-6, 1993.

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**, v. 78, p. 1372-80, 1997.

FULY, A. L.; CALIL-ELIAS, S.; ZINGALI, R.B.; GUIMARÃES, J.A.; MELO, P.A. Myotoxic activity of an acidic phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Toxicon**, v. 38, p.961-72, 2000.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, D.W.; HAWGOOD, B.J.; ELDER, H.Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon**, p. 85-98, 1984.

GUTIÉRREZ, J. M.; CERDAS, L. Mechanism of action of myotoxins isolated from snake venoms. **Rev Biol Trop**, v. 32, p. 213-22, 1984.

GUTIÉRREZ, J. M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26, p. 411-13, 1988.

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; GENE, J.A.; LOMONTE, B.; CAMACHO, Z.; SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon**, v.27, p. 735-45, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-24, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; CERDAS, L. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. **Toxicon**, v. 24, p. 885-94, 1986.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841-50, 2000.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F. ANGULO, Y. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. **Curr Pharm Des**, v. 13, p. 2935-50, 2007.

HAVT, A.; TOYAMA, M.H.; DO NASCIMENTO, N.R.F.; TOYAMA, D.O.; NOBRE, A.C.L.; MARTINS, A.M.C.; BARBOSA, P.S.; NOVELLO, J.C.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.M.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, p. 130-41, 2005.

HIGGINS, D.G.; THOMPSON, J.D.; GIDSON, T.J. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. **Meth Enzymol**, v.266, p. 383-402, 1996.

HIGUCHI, D.A.; BARBOSA, C.M.V. ; BINCOLETTO, C. ; CHAGAS, J.R. ; MAGALHÃES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F.; PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; PESQUERO, J.L. Purification and partial characterization of two phospholipases A₂ from *Bothrops leucurus* snake venom. **Biochimie**, v. 89, p. 319-28, 2007.

HOLLAND, D. R.; GLANCY, L.L.; MUCHMORE, S.W.; RYDE, T.J.; EINSPAHR, H.M.; FINZEL, B.C.; HEINRIKSON, R.L.; WATENPAUGH, K.D. The crystal structure of a Lysine 49 phospholipase A₂ from the venom of the cottonmouth snake at 2.0 Angstroms resolution. **J Biol Chem**, v. 265, p. 17649-56, 1990.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, p. 613-27, 1988.

HUANG, H. C.; LEE, C. Y. Isolation and pharmacological properties of phospholipases A_2 from *Vipera russelli* (Russell's viper) snake venom. **Toxicon**, v. 22, p. 207-17, 1984.

HUANG, M.Z.; GOPALAKRISHNAKONE, P.F.; KINI, R. M. role of enzymatic activity in the antiplatelet effects of a phospholipase A_2 from *Ophiophagus hannah* snake venom. **Life Sciences**, v. 61, p. 2211-17, 1997.

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A microbiuret method for estimating proteins. **Anal Biochem**, v. 9, p. 401-10, 1964.

IZIDORO, L. F. M.; RIBEIRO, M.C.; SOUZA, G.R.L.; SANT'ANA, C.D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, A.I.; GOULART, L.R.; BELEBONI, R.O.; NOMIZIO, A.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg Med Chem**, v. 14, p. 7034-43, 2006.

KAISER, I.I.; GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, J.M.; PLUMMER, D.; AIRD, S.D.; ODELL, G.V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch Biochem Biophys**, v.278, p. 319-25, 1990.

KANASHIRO, M.M.; ESCOCARD, R.C.M.; PETRETSKI, J.H.; PRATES, M.V.; ALVES, E.W.; MACHADO, O.L.T.; SILVA, W.D.; KIPNIS, T.L. Biochemical and biological properties of phospholipase A_2 from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochem Pharmacol**, v. 64, p. 1179-86, 2002.

KETELHUT, D.F.J.; HOMEM DE MELLO, M.; VERONESE, E.L.G.; ESMERALDINO, L.E.; MURAKAMI, M.T.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R.; CINTRA, A.C.O.; SAMPAIO, S.V. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A_2 isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v.85, p. 983-91, 2003.

KINI, R. M.; EVANS, H.J. Correlation between the enzymatic activity, anticoagulant and antiplatelet effects of phospholipase A_2 isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. **Thromb Haemost**, v.60, p. 170-3, 1988.

KINI, R. M.; EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, v.27, p. 613-35, 1989.

KINI, R. M.; EVANS, H.J. Effects of snake venom proteins on blood platelets. **Toxicon**, v.28, p. 1387-1422, 1990.

KINI, R. M. Phospholipase A₂: a complex multifunctional protein puzzle, 1997. In: R. M. Kini (Ed), *Venom Phospholipase A₂ enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, p. 1-28.

KINI, R. M.; CHAN, Y. M. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A₂ enzymes. **J Mol Evol**, v. 48, p. 125–32, 1999.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-40, 2003.

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, p. 1147-61, 2005.

KOH, D. C.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, p. 3030-41, 2006.

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

LANDUCCI, E.C.T.; CASTRO, R.C.; TOYAMA, M.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Inflammatory oedema induced by the Lys-49 phospholipase A₂ homologue piratoxin-I in the rat and rabbit. **Biochem Pharmacol**, v. 59, p. 1289-94, 2000.

LIPPS, B. V. Novel snake venom proteins cytolytic to cancer cells *in vitro* and *in vivo* systems. **J Venom Anim Toxins**, v. 5, 1999 .

LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon** v. 42, p. 963-77, 2003.

LOBO DE ARAÚJO, A.; RADVANYI, F.; BON, C. Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom: molecular and enzymatic properties. **Toxicon**, v. 32, p. 1069-81, 1994.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. A new muscle damaging toxin, myotoxin-II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Toxicon**, v. 27, p. 725-33, 1989.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; FURTADO, M.F.; OTERO, R.; ROSSO, J.P.; VARGAS, O.; CARMONA, E.; ROVIRA, M.E. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**, v. 28, p.1137-46, 1990.

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

LU, Q.M.; JIN, Y.; WEI, J.F.; WANG, W.Y.; XIONG, Y.L. Biochemical and biological properties of *Trimeresurus jerdonii* venom and characterization of a platelet aggregation-inhibiting acidic phospholipase A₂. **J Nat Toxins**, v. 11, p. 25-33, 2002.

MACHADO, O.L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R. Purification, physicochemical characterization and N-terminal-amino acid sequence of a phospholipase A₂ from *Bothrops jararaca* venom. **Braz J Med Biol Res**, v. 26, p. 163-6, 1993.

MAGRO, A. J.; SOARES A.M.; GIGLIO J.R.; FONTES M.R.M. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 311, p. 713–20, 2003.

MAGRO, A. J.; TAKEDA, A.A.S.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Structure of BthA-I complexed with p-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activity. **Acta Crystallogr**, v. 61, p. 1670–1677, 2005.

MAGRO, A.J. **Estudos estruturais experimentais e teóricos com proteínas do veneno da serpente *Bothrops jararacussu***. Tese de Doutorado, Botucatu, UNESP, 2006.

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**, v.33, p.615-26, 1995.

MARCHI-SALVADOR, D.P.; SILVEIRA, L.B.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of myotoxin-I, a Lys49-phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni*. **Acta Crystallogr**, v. 61, p. 882-84, 2005.

MARCHI-SALVADOR, D.P.; FERNANDES, C.A.H.; AMUI, S.F.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a myotoxic Lys-49-PLA₂ complexed with p-bromophenacyl bromide. **Acta Crystallogr**, v.62, p. 600-3, 2006.

MARCHI-SALVADOR, D.P. **Estudos estruturais com Lys49 fosfolipases A₂ nativas e complexadas com brometo de p-bromofenacila.** Tese de Doutorado, Botucatu, UNESP, 2008.

MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C.D.; OLIVEIRA, C.Z.; RUEDA, A.Q.; MENALDO, D.L.; BELEBONI, R.O.; STABELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.; SOARES, A.M. Snake venom phospholipase A₂ inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Curr Top Med Chem**, v.7, p.743-56, 2007.

MARKLAND, F.S. Antitumor action of crotalase, a defibrinogenating snake venom enzyme. **Semin Thromb Hemost**, v. 12, p. 284-90, 1986.

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

MOURA-DA-SILVA. A.M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R.D. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, v. 29, p. 713-73, 1991 .

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A₂. **J Biochem**, v.131, p. 285-92, 2002.

MURAKAMI, M.T.; GABDOULKHAKOV, A.; GENOV, N.; CINTRA, A.C.; BETZEL, C.; ARNI, R.K. Insights into metal ion binding in phospholipases A₂: ultra high-resolution crystal structures of an acidic phospholipase A₂ in the Ca²⁺ free and bound states. **Biochimie**, v.88, p. 543-9, 2006.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Secretory phospholipase A₂. **Biol Pharm Bull**, v. 27, n.8, p. 1158-64, 2004.

NEVALAINEN, T. J. PEURAVUORI, H. J. Phospholipase A₂ in cnidária. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 139, p. 731-5, 2004a.

NEVALAINEN, T. J.; QUINN, R. J.; HOOPER, J. N. Phospholipase A₂ in porífera. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 137, p. 413-20, 2004b.

NEVALAINEN, T.J.; GRAHAM, G.G.; SCOTT, K.F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂. **Biochim Biophys Acta**, v.1781, p. 1-9, 2008.

NISENBOM, H. E., SEKI, C.; VIDAL, J. C. Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (víbora de La Cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon**, v. 24, p. 259-72, 1986.

NÚÑEZ, V.; ARCE, V.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Structural and functional characterization of myotoxin-I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. **Toxicon**, v.44, p. 91–101, 2004.

PANINI, S. R., YANG, L., RUSINOL, A. E., SINENSKY, M. S., BONVENTRE, J. V., E LESLIE, C. C. Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol. **J. Lipid Res**, v. 42, p.1678-86, 2001.

PEARSON, W.R., LIPMAN, D.J. Improved tools for biological sequence comparisons. **Proc Natl Acad Sci**, v. 85 p. 2444-8, 1988.

PONCE-SOTO, L. A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1770 , p. 585–93, 2007.

RENETSEDER, R., BRUNIE, S., DIJKSTRA, B.W., DRENT, J., SIGLER, P.B. A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J Biol Chem**, v. 260, p.11627-34, 1985.

RENETSEDER, R.; DIJKSTRA, B. W.; HUIZINGA, K.; KALK, K. H.; DRENT, J. Crystal structure of bovine pancreatic phospholipase A₂ covalently inhibited by p-bromo-phenacyl-bromide. **J Biol Chem**, v. 200, p.181-8, 1988.

RIGDEN, D. J.; HWA, L.W.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; POLIKARPOV, I. The structure of the D49 phospholipase A₂ piratoxin III from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: possible relationship to cooperative substrate binding. **Acta Crystallogr**, v. 59, p. 255-62, 2003.

ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, J.O.; ASTOLFI-FILHO, S.; NOMIZO, A.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.M.; SOARES, A.M.; FRANÇA, S.C. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom. **Protein J.**, v. 23, p. 273-85, 2004.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A.M.; MANCIN, A.C.; FONTES, M.R.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comp Biochem Physiol**, v. 121, p. 215-22, 1998.

RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R.S.; DE ARAÚJO, A.L.; MALTA-NETO, N.R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E.A.V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, p. 305–14, 2004.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L.F.; TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; GIGLIO, J.R.; FULY, A.L.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, p. 153–65, 2007.

ROSENBERG, P.; CONDREA, E.; RAPUANO, B.E.; SOONS, K.R.; YANG, C.C. Dissociation of pharmacological and enzymatic activities of snake venom phospholipases A₂ by modification of carboxylate groups. **Biochem Pharmacol**, v. 32, p. 3525-30, 1983.

RUDRAMMAJI, L.M.S.; GOWDA, T.V. Purification and characterization of three acidic, cytotoxic phospholipases A₂ from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. **Toxicon**, v. 36, p.921-32, 1998.

RUGGERI, Z. M.; MENDOLICCHIO, G. L. Adhesion mechanisms in platelet function. **Circ Res**, v. 100, p. 1673-85, 2007.

SANTOS-FILHO, N.A.; SILVEIRA, L.B.; OLIVEIRA, C.Z.; BERNARDES, C.P.; MENALDO, D.L.; FULY, A.L.; ARANTES, E.C.; SAMPAIO, S.V.; MAMEDE, C.C.N.; BELETTI, M.E.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A.M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 908-17, 2008.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, p. 1246-59, 2006.

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**, v. 267, p. 22645-57, 1992.

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**, v. 28, p. 261-273, 1990.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; WHITE, S. P.; OWNBY, C. L. Sequence analysis of Lys49 phospholipase A₂ myotoxins: a highly conserved class of proteins. **Toxicon**, v.34, p.1237-42, 1996.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; SOUZA, D.H.F. **Métodos em Toxinologia: toxinas de serpentes**. EdUFSCAR, 2007.

SERRANO, S.M.; MENTELE, R.; FINK, E. Purification, characterization and aminoacid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 34, p. 7186-93, 1995.

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

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A_2 enzymes: classification and characterization. **Biochim Biophys Acta**, v.1488, p. 1-19, 2000.

SINGH, G.; GOURINATH, S.; SARAVANAN, K.; SHARNA, S.; BHANUMATHI, S.; BETZEL, CH.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T.P. Sequence-induced trimerization of phospholipase A_2 : structure of a trimeric isoform of PLA₂ from common krait (*Bungarus caeruleus*) at 2.5Å resolution. **Acta Crystallogr**, v. 61, p. 8-13, 2005.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; TOYAMA, M.H.; LOMBARDI, F.R.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. A rapid procedure for the isolation of the Lys49 myotoxin-II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v. 36, p. 503-14, 1998.

SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; ARNI, R.K.; GIGLIO J.R. Structural and functional characterization of myotoxin-I, a Lys49 phospholipase A_2 homologue from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 373, p. 7–15, 2000a.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.R.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A_2 homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 378, p. 201–9, 2000b.

SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; BORTOLETO, R.K.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; ARNI, R.K.; WARD, R.J.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A_2 from *Bothrops pirajai* snake venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 387, p. 188–96, 2001.

SOARES A. M.; GIGLIO J. R. Chemical modifications of phospholipases A_2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon** , v. 42 , p. 855–68, 2003.

SOARES A. M.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO J. R. Phospholipase A_2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Curr Org Chem**, v. 8, p. 1-14, 2004.

STÁBELI, R.G.; AMUI, S.F.; SANT'ANA, D.; PIRES, M.G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M.C.; ROMÃO, P.R.T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.M.; SOARES, A.M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comp Biochem Physiol**, v. 142, p. 371-81, 2006.

TOYAMA, M. H., MANCUSO, L.C.; GIGLIO, J.R.; NOVELLO, J.C.; OLIVEIRA, B.; MARAGONI, S. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-I and II, two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom. N-terminal sequencing. **Biochem Mol Biol Int**, v.37, p.1047-55. 1995.

TOYAMA, M. H.; SOARES, A.M.; VIEIRA, C.; 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-Bromophenancyl bromide. **J Prot Chem**, v. 17, p. 713-8, 1998.

TOYAMA, M. H.; COSTA, P.D.; NOVELLO, J.C.; DE OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A.; MARANGONI, S. Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA₂ and anticoagulant activities and high myotoxic activity. **J Protein Chem**, v.18, n.3, p.371-8. 1999.

TOYAMA, M. H.; SOARES, A.M.; WEN-HWA, L.; POLIKARPOV, I.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-II, a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Biochimie**, v. 82, p. 245-50, 2000.

TRUMP, B.F.; BEREZESKY, I.K.; OSERNIO-VARGAS, A.R. 1981. All death the disease process. The role of calcium. In: Bower, I.D.; Loskshin, R.A. Chapman death in Biology and Patology.

TU, A.T. Overview of snake venom chemistry. Adv. Exp. Med. Biol. 391, p. 37-62, 1996. In: Matsui, T., Y. Fujimura, et al. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim Biophys Acta**, v.1477, p.146-56. 2000.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂. **Biochimie**, v.82, p. 815-31, 2000.

VAN DE BOSCH, H. Intracellular phospholipases A. **Biochim Biophys Acta**, v.604, p. 191-246, 1980.

VERHEIJ, H. M.; VOLWERK, J.J.; JANSEN, E.H.J.M.; PUYK, W.C.; DIJKSTRA, B.W.; DRENTH, J.; HAAS, G.H. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂, role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry**, v.19, p. 743-48, 1980.

VERHEIJ, H. M; SLOTBOOM, A.J.; DE HAAS, G.H. Structure and function of phospholipase A₂, 1981. In; Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, v. 91, p. 91.

VESTERBERG, O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. **Biochem Biophys Acta**, v. 257, p. 11-3, 1972.

YANG, W.L.; PENG, L.S.; ZHONG, X.F.; WEI, J.W.; JIANG, X.Y.; YE, L.T.; ZOU, L.; TU, H.B.; WU, W.Y.; XU, A.L. Functional expression and characterization of a recombinant phospholipase A₂ from sea snake *Lapemis hardwickii* as a soluble protein in *E. coli*. **Toxicon**, v. 41, p. 713-21, 2003.

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. **Biochemistry**, v. 32, p. 6484-92, 1993.

ZHAO, H.; TANG, L.; WANG, X.; ZHOU, Y.; ZHENGJIONG, LIN. Structure of a snake venom phospholipase A₂ modified by p-bromo-phenacyl-bromide. **Toxicon**, v. 36, p. 875-86, 1998.

ZINGALI, R.B. JANDROT-PERRUS, M.; GUILLIN, M.C.; BON, C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, v. 32, p. 10794-802, 1993.

ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v.45, p. 335-46, 2005.

WACKLIN, H. P.; TIBERG, F.; FRAGNETO, G.; THOMAS, R.K. Distribution of reaction products in phospholipase A₂ hydrolysis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1768, p. 1036-49, 2007.

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

WARD, R.J.; OLIVEIRA, A.H.; BORTOLETO, R.K.; ROSA, J.C.; FAÇA, V.M.; GREENE, L.J. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Protein Expr Purif**, v. 21, p. 134-40, 2001.

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphatepolyacrylamide gel electrophoresis. **J Biol Chem**, v. 224, p.4406, 1969.