UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização funcional e estrutural de inibidores de fosfolipases A_2 isolados do plasma de serpente *Bothrops jararacussu*

Clayton Zambeli Oliveira

Ribeirão Preto

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização funcional e estrutural de inibidores de fosfolipases A_2 isolados do plasma de serpente *Bothrops jararacussu*

Clayton Zambeli Oliveira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Toxicologia.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Andreimar Martins Soares

RIBEIRÃO PRETO
2009

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Clayton Zambeli

Caracterização funcional e estrutural de inibidores de fosfolipases A_2 isolados do plasma de serpente *Bothrops jararacussu*. Ribeirão Preto, 2009.

113 p.: il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP -- Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Soares, Andreimar Martins

1. Peçonha de Serpente. 2. *Bothrops jararacussu*. 3. Inibidor de Fosfolipases A_2. 4. Inibidor de Miotoxinas. 5. Fosfolipases A_2. 6. Caracterização Bioquímica. 7. Terapia Suplementar.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Clayton Zambeli Oliveira

Título do trabalho: Caracterização funcional e estrutural de inibidores de fosfolipases A_2 isolados do plasma de serpente *Bothrops jararacussu*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Toxicologia.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Andreimar Martins Soares

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Ao meu Pai e minha Mãe,

Por me guiarem e servirem de exemplos de vida;

Ao meu irmão,

Pela amizade e carinho;

Aos meus familiares, meus professores e amigos que compartilham comigo esta experiência tão bela que é a vida;

OFEREÇO

Ao meu orientador Prof. Dr. Andreimar Martins Soares que incentivou a participação nesta jornada de conhecimentos, compartilhando suas idéias e reflexões e possibilitando assim o aperfeiçoamento técnico-científico, contribuindo com aportes intelectuais e discussões técnicas, de grande valia para a elaboração do trabalho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudo concedida, de vital importância para a elaboração desta pesquisa e a Universidade de São Paulo - USP pela disponibilização da estrutura.

Aos professores colaboradores Dra. Eliane C. Arantes, Dr. Bruno Lomonte e Dr. Rodrigo G. Stábeli que contribuíram de forma essencial para a conclusão deste trabalho.

Especialmente aos amigos de estudo Silvana e Danilo que desde meu ingresso na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) estiveram comigo diariamente contribuindo com idéias, revisão de trabalhos, ensinamentos e desenvolvimento das pesquisas.

Novamente ao Danilo pelas traduções dos trabalhos para o inglês que foi fundamental para a conclusão da Tese.

Aos amigos de estudo Renata, Norival, Lucas, Carolina Petri, Carol, Tássia, Sabrina e Johara os quais nos meus incansáveis dias de trabalho em bancada, estiveram sempre presentes e tiveram papel fundamental para a conclusão da Tese.

Aos amigos de outros laboratórios Saulo, Daniela, Flávia, Daniel, Raquel e Gilmara.

Aos técnicos, especialistas e secretárias Ana, Adélia, Franco, Hosana, Beto, Reinaldo, Cristiane, Nancy pelo auxílio técnico-especializado.

Aos colegas do serpentário Luiz Henrique e Denise.

Ao grande ser humano e amigo Goby por sempre me ajudar.

A DEUS por direcionar minha vida, e assim ter encontrado minha verdadeira vocação.

RESUMO

OLIVEIRA, C. Z. **Caracterização funcional e estrutural de inibidores de fosfolipases A_2 do plasma de serpente *Bothrops jararacussu*.** 2009. 113f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

As fosfolipases A_2 (PLA_2s) de peçonhas de serpentes compreendem um grupo de enzimas de massas moleculares variáveis entre 14.000 e 18.000, e são responsáveis por vários efeitos tóxicos induzidos pela peçonha destes animais, tornando-se necessária a busca por inibidores naturais de PLA_2s. O presente trabalho propôs a caracterização bioquímica, farmacológica e estrutural de duas proteínas inibitórias isoladas do plasma da serpente *Bothrops jararacussu* (BjussuMIPs), que neutralizam as atividades enzimáticas, tóxicas e farmacológicas de diferentes PLA_2s. Estes inibidores foram isolados por cromatografia de afinidade em miotoxina-Sepharose, demonstrando que ambos são glicoproteínas com massas moleculares de 24.000 (αBjussuMIP) e 23.500 (γBjussuMIP) para os monômeros e de 120.000 (αBjussuMIP) e 160.000 (γBjussuMIP) para os oligômeros. O tratamento dos BjussuMIPs com a N-glicosidase F reduziram os seus pesos moleculares para aproximadamente 18.000, mas não afetaram suas atividades inibitórias sobre PLA_2s, sugerindo que os carboidratos tem pouco ou nenhum papel na associação dos BjussuMIPs com estas enzimas. A análise do αBjussuMIP por dicroísmo circular mostrou 44% de α-hélice, 18% de folhas β, 10% de voltas β e 28% de estruturas aleatórias. O cDNA obtido por PCR a partir do fígado desta serpente revelou 432 pb (αBjussuMIP) e 543 pb (γBjussuMIP) que codificam para 144 e 181 resíduos de aminoácidos, respectivamente. O alinhamento da sequência de αBjussuMIP com a de outros inibidores do tipo α, denominados de αPLIs, apresentou 73-92% de similaridade e o γBjussuMIP mostrou 89-94% com inibidores do tipo γPLIs. Os BjussuMIPs demonstraram ser relativamente estável a variações de pH (6-12) e temperatura, entretanto, perderam atividade inibitória quando submetido a altas temperaturas. A caracterização funcional indica que os BjussuMIPs apresentaram propriedades inibitórias sobre diferentes PLA_2s isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. Ambos BjussuMIPs revelaram propriedades farmacológicas como a inibição das atividades fosfolipásica, anticoagulante, miotóxica, indução de edema, citotóxica, bactericida e letal. Os resultados obtidos demonstram que o αBjussuMIP mostra maior afinidade sobre as PLA_2s homólogas Lys49 como BthTX-I e PrTX-I, enquanto que o γBjussuMIP apresenta-se mais específico para PLA_2s Asp49, sugerindo uma especificidade entre os BjussuMIPs e tipos de PLA_2s. Além disso, ambos os inibidores mostraram ser eficazes na suplementação do antiveneno botrópico em diferentes concentrações, resultando no aumento da capacidade do soro em neutralizar toxinas de serpentes. Os aspectos abordados neste trabalho poderão trazer informações complementares sobre possíveis mecanismos de ação, podendo resultar no melhor entendimento dos efeitos inibitórios exercidos pelos BjussuMIPs, assim como auxiliar o tratamento do envenenamento ofídico pela suplementação da soroterapia tradicional.

Palavras-chave: *Bothrops jararacussu,* inibidores de fosfolipases A_2, Inibidores de miotoxinas, fosfolipases A_2, peçonha de serpente, caracterização bioquímica, terapia suplementar.

ABSTRACT

OLIVEIRA, C. Z. **Functional and structural characterization of phospholipase A_2 inhibitors from *Bothrops jararacussu* snake plasma.** 2009. 113f. Thesis (Doctorate). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Phospholipases A_2 (PLA_2s) from snake venoms comprise a group of enzymes with molecular weights varying from 14,000 to 18,000, and are responsible for several toxic effects induced by the venom of these animals, making important the search for natural inhibitors of PLA_2s. The present work proposed the biochemical, pharmacological and structural characterization of two protein inhibitors isolated from the plasma of *Bothrops jararacussu* snake (BjussuMIPs), which neutralize the enzymatic, toxic and pharmacological activities of different PLA_2s. These inhibitors were isolated by an affinity chromatography on myotoxin-Sepharose, showing that both are glycoproteins with molecular weights of 24,000 (αBjussuMIP) and 23,500 (γBjussuMIP) for the monomers and 120,000 (αBjussuMIP) and 160,000 (γBjussuMIP) for the oligomers. The treatment of BjussuMIPs with N-glucosidase F reduced their molecular weights to about 18,000, but did not affect their inhibitory activity on PLA_2s, suggesting that the carbohydrates have little or no role in the association of these BjussuMIPs with these enzymes. The analysis of αBjussuMIP by circular dichroism showed 44% of α-helix, 18% of β sheets, 10% of β turns and 28% of random structures. The cDNA obtained by PCR from the snake liver showed 432 bp for αBjussuMIP and 543 bp for γBjussuMIP, which encode for 144 and 181 amino acid residues, respectively. The alignment of the sequence of αBjussuMIP with those from other α-inhibitors (αPLIs) showed 73-92% of similarity and 89-94% for the γBjussuMIP compared to other γPLIs. The BjussuMIPs showed to be relatively stable to changes in pH (6-12) and temperature, however lost of its activity when submitted to high temperatures. The functional characterization indicates that both BjussuMIPs presented inhibitory properties on different snake venom PLA_2s from the genera *Bothrops* and *Crotalus*. Both BjussuMIPs showed pharmacological properties such as inhibition of phospholipase, anticoagulant, myotoxic, cytotoxic, bactericidal, edema-inducing and lethal activities. The results show that αBjussuMIP presents higher affinity to Lys49-PLA_2 homologous, such as BthTX-I and PrTX-I, while γBjussuMIP is more specific to Asp49-PLA_2s, suggesting specificity between BjussuMIPs and types of PLA_2s. Moreover, both inhibitors proved effective in the supplementation of *Bothrops* antivenom at different concentrations, resulting in an increased capacity of serum in neutralizing snake toxins. The issues reported in this work could bring additional information on possible mechanisms of action and may result in better understanding of the inhibitory effects exerted by these BjussuMIPs, as well as assist the treatment of ophidian envenomations by supplementation of the traditional serum therapy.

Keywords: *Bothrops jararacussu*, phospholipase A_2 inhibitors, myotoxins inhibitors, phospholipase A_2, snake venoms, biochemical characterization, supplementary therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos principais agentes que causaram intoxicações em seres humanos no Brasil em 2006 3

Figura 2. Distribuição dos principais envenenamentos por animais peçonhentos em 2006 3

Figura 3. Sítios de ação das fosfolipases 5

Figura 4. Representação dos resíduos de aminoácidos 27-33 e resíduo 49, que compreendem a alça de ligação do cálcio das PLA_2s 9

Figura 5. Cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose das PLA_2s 42

Figura 6. Processo de purificação dos BjussuMIPs 44

Figura 7. Determinação das massas moleculares e p*I* 45

Figura 8. Espectros de dicroísmo circular do αBjussuMIP em associação com a BthTX-I 47

Figura 9. cDNA e sequência de aminoácido de αBjussuMIP 49

Figura 10. Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de αBjussuMIP com outros PLIs 50

Figura 11. Predição da estrutura de αBjussuMIP 51

Figura 12. cDNA e sequência de aminoácidos do γBjussuMIP 57

Figura 13. Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de γBjussuMIP com outros PLIs 58

Figura 14. Estabilidade da atividade inibitória dos BjussuMIPs 67

Figura 15. Inibição da atividade fosfolipásica de PLA_2s 68

Figura 16. Inibição da atividade anticoagulante de PLA_2s 69

Figura 17. Inibição do edema induzido por PLA_2s 70

Figura 18. Inibição da miotoxicidade induzida por PLA_2s 71

Figura 19. Inibição da citotoxicidade de PLA_2s 72

Figura 20. Inibição da atividade bactericida de PLA_2s 73

Figura 21. Propriedades neutralizantes do soro antibotrópico suplementado com BjussuMIPs 74

Figura 22. Representação esquemática estrutural do receptor tipo M e interação com as PLA_2s 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição em aminoácidos dos inibidores plasmáticos isolados de serpente *Bothrops jararacussu* 46

Tabela 2 Perfil da massa molecular dos peptídeos trípticos do αBjussuMIP por MALDI-TOF-MS 52

Tabela 3 Sítios de fosforilação no αBjussuMIP comparado com outros αPLIs..... 53

Tabela 4 Comparação das sequências codificadoras de aminoácidos para o αBjussuMIP e outros αPLIs do gênero *Bothrops*..... 54

Tabela 5 Perfil da massa molecular dos peptídeos trípticos do γBjussuMIP por MALDI-TOF-MS 59

Tabela 6 Sítios de fosforilação no γBjussuMIP comparado com outros γPLIs... 60

Tabela 7 Comparação das sequências codificadoras de aminoácidos para o γBjussuMIP e outros γPLIs do gênero *Bothrops* 61

Tabela 8 Comparação de neutralização entre os inibidores do tipo α e γ 75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Distribuição de diferentes tipos de PLIs 16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **ABM:** atividade bactericida mínima
- **Ambic:** tampão bicarbonato de amônio
- **BjussuMIP:** proteínas inibidoras de miotoxinas isoladas do plasma da serpente *Bothrops jararacussu*
- **BPB:** brometo de *p*-bromofenacila
- **BthTX-I e II:** miotoxinas I (Lys49) e II (Asp49) isoladas de peçonha de *Bothrops jararacussu*
- **CB:** crotoxina B isolada de peçonha de *Crotalus durissus terrificus*
- **CIM:** concentração inibitória mínima
- **Dhem:** dose hemolítica mínima
- **DRC:** domínio de reconhecimento de carboidrato
- **EDTA:** ácido etilenodiamina tetraácetico
- **HPLC:** "high performance liquid chromatography" [cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE)].
- **i.d.:** via intradérmica
- **i.m.:** via intramuscular
- **MIP:** proteína inibitória de miotoxina
- **M*r*:** massa molecular relativa
- **PBS:** tampão fosfato em salina
- **p*I*:** ponto isoelétrico
- **PLA_2:** fosfolipases A_2
- **PLIs:** inibidores de fosfolipase A_2
- **PrTX-I e III:** miotoxinas I (Lys49) e II (Asp49) isoladas de peçonha de *Bothrops pirajai*
- **SDS-PAGE:** eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

RESUMO i

ABSTRACT ii

LISTA DE FIGURAS iii

LISTA DE TABELAS v

LISTA DE QUADROS vi

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS vii

1. INTRODUÇÃO 2

1.1. Peçonhas de serpentes 4

1.2. Fosfolipases A_2 5

1.3. Inibidores de PLA_2s 10

1.4. Inibidores de PLA_2s isolados de serpentes (PLIs) 12

2. OBJETIVOS 18

2.1. Objetivos específicos 18

3. MATERIAL 20

3.1. Peçonha 20

3.2. Animais 20

3.3. Plasma humano 20

3.4. Reagentes e Equipamentos 21

4. METODOLOGIA 24

4.1. Caracterização bioquímica 24

4.1.1. Isolamento de PLA_2s 24

4.1.2. Isolamento dos inibidores de PLA_2s (PLIs) 26

4.1.3. Caracterização bioquímica dos inibidores de PLA_2 (PLIs) 28

4.2. Caracterização estrutural dos PLIs 30

4.2.1. Sequenciamento N-terminal e espectrometria de massa 30

4.2.2. Dicroísmo circular do αBjussuMIP 30

4.2.3. Clonagem de cDNA e sequenciamento 31

4.2.4. Predição de estruturas 32

4.3. Avaliação do efeito inibidor de BjussuMIPs sobre atividades biológicas de PLA_2s de peçonhas de serpentes 33

4.3.1. Inibição da atividade fosfolipásica indireta 33

4.3.2. Inibição da atividade anticoagulante 34

4.3.3. Inibição da atividade miotóxica 35

4.3.4. Inibição do edema 36

4.3.5. Inibição da atividade citotóxica 36

4.3.6. Inibição da atividade bactericida 37

4.3.7. Inibição da letalidade.....38
4.4. Avaliação da potencialidade de ação dos BjussuMIPs na suplementação do soro antibotrópico 38
4.5. Análise estatística dos resultados.....39

5. RESULTADOS.....41
5.1. Isolamento das Fosfolipases A_2 das peçonhas de *B. jararacussu*, *B. pirajai* e *C. d. terrificus* e determinação de seus pesos moleculares.....41
5.2. Isolamento e caracterização bioquímica dos inibidores de PLA_2s (PLIs) 43
5.3. Caracterização estrutural dos PLIs.....47
5.3.1. PLI do tipo α 47
5.3.1.1. Dicroísmo circular 47
5.3.1.2. Caracterização molecular do inibidor tipo α.....48
5.3.2. PLI do tipo γ 56
5.3.2.1. Caracterização molecular do inibidor tipo γ 56
5.4. Propriedades Inibitórias dos MIPs 63
5.4.1. Avaliação da estabilidade bioquímica dos inibidores 63
5.4.2. Inibição da atividade fosfolipásica indireta das PLA_2s pelos inibidores....63
5.4.3. Inibição da atividade anticoagulante das PLA_2s pelos inibidores.....64
5.4.4. Inibição da atividade edematogênica das PLA_2s pelos inibidores.....64
5.4.5. Inibição da atividade miotóxica das PLA_2s pelos inibidores.....65
5.4.6. Inibição da atividade citotóxica das PLA_2s pelos inibidores 65
5.4.7. Inibição da atividade bactericida das PLA_2s pelos inibidores.....65
5.4.8. Inibição da atividade de letalidade das PLA_2s pelos inibidores.....66
5.4.9. Inibição da atividade miotóxica da peçonha de *Bothrops jararacussu* após suplementação do soro antibrópico com BjussuMIPs 66

6. DISCUSSÃO 77
6.1. Isolamento das PLA_2s das peçonhas de *B. jararacussu*, *B. pirajai* e *C. d. terrificus* e determinação do peso molecular das PLA_2s (SDS-PAGE).....77
6.2. Inibidores de PLA_2s (PLIs) e BjussuMIPs.....78
6.3. Caracterização estrutural dos PLIs.....80
6.3.1. PLI do tipo α 80
6.3.2. PLI do tipo γ 83
6.4. Propriedades Inibitórias dos BjussuMIPs.....84

7. CONCLUSÕES 91

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 94

ANEXOS ..... Erro! Indicador não definido.

ARTIGO PUBLICADO

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os principais agentes que causaram intoxicações em seres humanos no Brasil foram os medicamentos, os animais peçonhentos e os domissanitários (SINITOX, 2009), sendo que os acidentes com animais são representados por dados estatísticos relevantes (Figura 1).

O envenenamento humano por serpentes é um problema de saúde pública em nível mundial, o qual tem um significante papel social e econômico. A estimativa global de acidentes ofídicos é de 2,5 milhões de casos por ano, produzindo mais de 100.000 mortes (CALVETE; JUAREZ; SANZ, 2007), especialmente em áreas rurais de países tropicais e subtropicais, localizados em continentes como a Ásia, África, Oceania, América Central e do Sul (THEAKSTON; WARRELL; GRIFFITHS, 2003; GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006). A soroterapia é o principal tratamento utilizado nos casos de envenenamento por acidentes com serpentes peçonhentas (GUTIÉRREZ et al., 2007). Embora se mostre efetiva para a maioria dos casos, esta terapia apresenta reações adversas (GARCIA et al., 2002; SCHMIDT, 2005), que podem ser classificadas em cutâneas (urticária e angioedema), gastrointestinais (náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarréia), respiratórias (rouquidão e broncoespasmo) e cardiovasculares (hipotensão e choque) (GARRISON, 1990; BOCHNER; LICHTENSTEIN, 1991).

Adicionalmente, a soroterapia apresenta um maior potencial terapêutico sobre efeitos sistêmicos do envenenamento, não sendo capaz de combater com eficiência a progressão dos efeitos locais (CARDOSO et al., 2003).

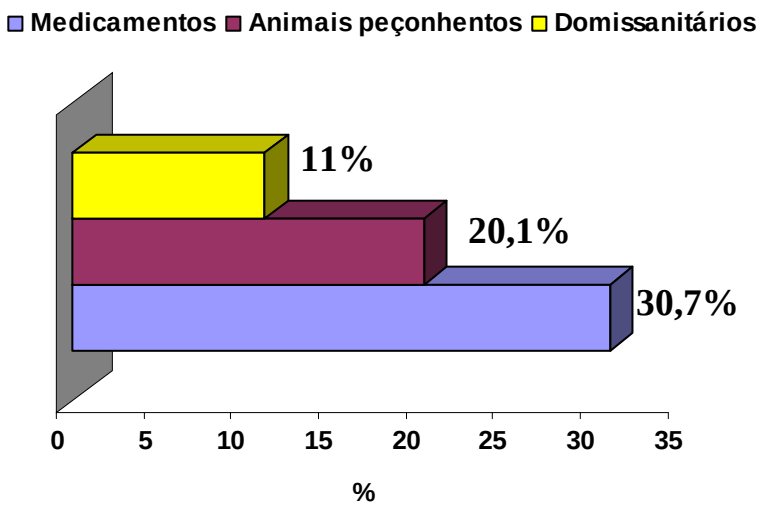

Figura 1. **Distribuição dos principais agentes que causaram intoxicações em seres humanos no Brasil em 2006** (Adaptado de SINITOX, 2009).

Dentre os 22.632 envenenamentos por animais peçonhentos registrados em 2006, os escorpiões foram os principais responsáveis, seguidos das serpentes, aranhas e outros animais (Figura 2).

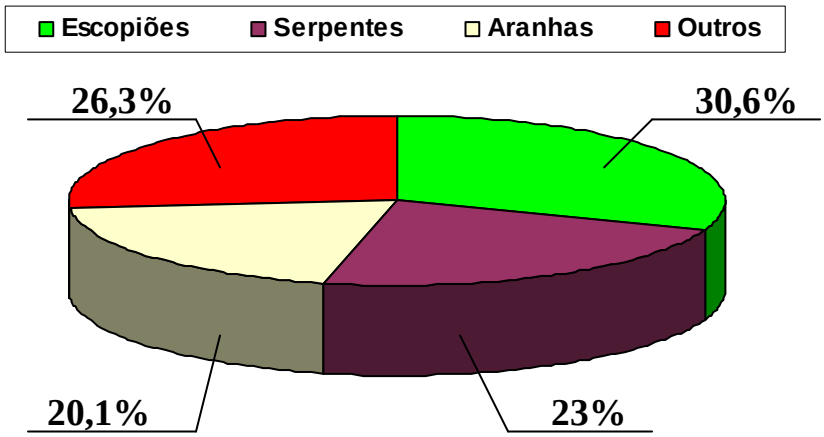

Figura 2. Distribuição dos principais envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil em 2006 (Adaptado de SINITOX, 2009).

1.1. Peçonhas de serpentes

As peçonhas de serpentes são constituídas por várias substâncias bioativas que podem estimular a liberação de mediadores inflamatórios como histamina e bradicinina e resultar em pronunciados efeitos locais como hemorragia e necrose (VITAL-BRAZIL, 1982). A maior parte dos componentes encontradas nas peçonhas de serpentes são proteínas (90-95%) e estas são responsáveis pelas atividades enzimáticas. Dentre os componentes das peçonhas de serpentes podemos destacar as citotoxinas, cardiotoxinas, fatores de crescimento de nervos (NGF), lectinas e também várias enzimas, dentre estas, proteases, fosfolipases A_2 (PLA_2s), metaloproteases (svMP), serinoproteases (svSP), fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, L-aminoácido oxidases (LAAO), catalases, ATPases, hialuronidases e β-glucosaminidases (TU, 1996).

No mundo há aproximadamente 2900 espécies de serpentes e destas, 321 são encontradas no Brasil sendo pertencentes aos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* (CARDOSO et al., 2003). Os gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, pertencem à família Viperidae, destacam-se pelo grande número de acidentes e alta toxicidade de suas peçonhas.

No envenenamento por *Crotalus* são observados principalmente os efeitos neurotóxico, miotóxico e coagulante (VITAL-BRAZIL, 1980; RAW et al., 1986; ROSSI et al., 1989).

O gênero *Bothrops* foi o maior responsável pelos acidentes ofídicos no Brasil, no ano de 2007 representando 87,5%, seguido de *Crotalus* 9,2%, *Lachesis* 2,7% e *Micrurus* 0,6% (MINISTÉRIO da SAÚDE, 2007). A peçonha botrópica pode induzir efeitos locais que incluem sintomas como dor, edema, hemorragia e necrose, e

adicionalmente distúrbios sistêmicos como coagulopatias, hemorragia sistêmica e falência renal. A mionecrose pode resultar de uma ação direta de PLA_2s sobre as membranas plasmáticas de células musculares, ou indiretamente como consequência de degeneração de vasos sanguíneos e isquemia (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). As PLA_2s constituem um dos componentes mais abundantes das peçonhas de serpentes (KINI, 2005).

1.2. Fosfolipases A_2

As fosfolipases A_2 são enzimas que catalisam hidrólise especificamente na posição *sn*-2 dos fosfolipídios que compõem as membranas celulares, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídios (KUDO; MURAKAMI, 2002) (Figura 3).

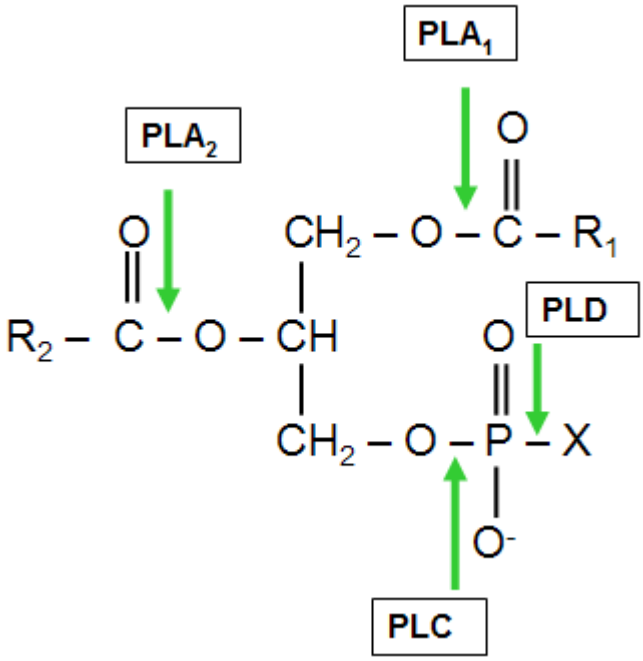

Figura 3. Sítios de ação das fosfolipases. R_1 e R_2 referem-se aos ácidos graxos nas posições *sn*-1 e *sn*-2 dos fosfolipídios numerados estereoespecificamente. As ligações hidrolisadas por outras fosfolipases, denominadas de acordo com suas especificidades, também estão indicadas (Adaptado de SELISTRE-DE-ARAÚJO; de SOUZA, 2007).

Estas enzimas desempenham papéis importantes no metabolismo de lipídios, e estão relacionadas com a liberação de ácido araquidônico (AA), um precursor de lipídios bioativos, assim como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, que podem estar envolvidos em diversas funções biológicas, tais como regulação da resposta imune, inflamação e percepção da dor (DENNIS, 2000; TSUBOI; SUGIMOTO; ICHIKAWA, 2002; KINI, 2005; SCHALOSKE; DENNIS, 2006; de MARIA et al., 2007).

As fosfolipases A_2 podem ser encontradas em tecidos de mamíferos, bactérias, plantas, venenos de insetos e répteis. Além disso, estão envolvidas em efeitos farmacológicos e fisiopatológicos dos organismos vivos e em envenenamentos por serpentes e abelhas, sendo, portanto de grande interesse médico-científico (VAN DEN BOSCH, 1980; VERHEIJ; SLOTBOOM; de HAAS, 1981; DENNIS, 1994; NEVALAINEN et al., 2004; SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004).

Atualmente as fosfolipases A_2 constituem uma superfamília de proteínas e são classificadas em 15 grupos e seus subgrupos, que incluem cinco tipos de enzimas diferentes. As fosfolipases A_2 podem ser classificadas de acordo com sua origem, sequência de aminoácidos, mecanismos catalíticos e outras características bioquímicas adicionais, tais como o peso molecular e o padrão de pontes dissulfeto (DENNIS, 1994; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As citosólicas ($cPLA_2$) são grandes proteínas com M*r* entre 61.000 e 114.000 e utilizam um resíduo de serina catalítico. As enzimas independentes de Ca^{2+} ($iPLA_2$), que também utilizam uma serina para catálise, e as acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH), que possuem uma serina no sítio catalítico e hidrolisam o grupo acetil da posição *sn*-2 de fatores ativadores de

plaquetas (PAF). As PLA_2s lisossomais são representadas pelo grupo XV, e apresentam tríade catalítica Ser/His/Asp (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As denominadas fosfolipases A_2 secretadas ($sPLA_2$) apresentam M*r* variando entre 14.000 e 18.000, geralmente contendo de 5 a 8 pontes dissulfeto. Essas enzimas possuem uma histidina no sítio ativo e requerem a presença do íon Ca^{2+} para a realização de catálise (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As fosfolipases A_2 encontradas nas peçonhas de serpentes ($svPLA_2$s) são classificadas nos grupos I e II. As fosfolipases A_2 do grupo I possuem dois a três aminoácidos inseridos na região 52-65, chamada de “loop elapídico”, sendo isoladas das peçonhas de serpentes da família Elapidae (Subfamília: Elapinae e Hydrophiinae). As do grupo II são caracterizadas pela falta da ligação Cys11-Cys77 que é substituída por uma ponte dissulfeto alternativa entre Cys51-Cys133, além disso, apresentam de cinco a sete aminoácidos estendendo a região C-terminal, sendo encontradas em peçonhas de serpentes da família Viperidae (Subfamília: Viperinae e Crotalinae) (ARNI; WARD, 1996).

As enzimas do grupo II são classificadas em dois subgrupos: as PLA_2s Asp49 cataliticamente ativas, assim nomeadas por possuírem um resíduo de aspartato na posição 49, e as fosfolipases A_2 homólogas (PLA_2s Lys49), nas quais o resíduo de aspartato é substituído por um resíduo de lisina na mesma posição, tornando-as cataliticamente inativas ou com atividade baixa (MARAGANORE et al., 1984; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; ARNI; WARD, 1996; WANG et al., 1996; OWNBY et al., 1999; SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004).

O cofator essencial para a catálise das fosfolipases A_2 é o cálcio, e sua substituição por outros íons divalentes como o bário e o cádmio produzem uma significante redução da atividade (YU; BERG; JAIN, 1993). As fosfolipases A_2 Asp49

requerem cálcio para estabilizar a conformação catalítica, apresentando um sítio de ligação de cálcio (VERHEIJ et al., 1980) que é constituído pelo grupo β-carboxílico do Asp49 e os grupos C=O carbonílicos da Tyr28, Gly30 e Gly32 (FLEER; VERHEIJ; de HAAS, 1981). A presença de duas moléculas de água estruturalmente conservadas completa a esfera de coordenação do Ca^{2+} formando uma pirâmide pentagonal (SCOTT et al., 1990) (Figura 4). Desta forma, a substituição do resíduo Asp49 por Lys49 altera significativamente o sítio de ligação de Ca^{2+} nas fosfolipases A_2, impedindo sua ligação e resultando em baixa ou inexistente atividade catalítica. Portanto, o resíduo Asp49 é de fundamental importância para o mecanismo catalítico das fosfolipases A_2. É provável que isto ocorra devido à capacidade de ligar e orientar o íon cálcio, no entanto, não há diferença relevante entre Asp49 e Lys49 em relação à estabilidade da conformação estrutural dessas enzimas (LI et al., 1994). Devido à variedade de efeitos tóxicos destas PLA_2s dentre estes, a neurotoxicidade (BON et al., 1979), miotoxicidade (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995), inibição ou indução da agregação plaquetária (KINI; EVANS, 1989; YUAN et al., 1993), hemólise (CONDREA; YANG; ROSENBERG, 1981) e edema (LLORET; MORENO, 1993), diversas pesquisas tem sido realizadas em busca de inibidores de fosfolipases A_2.

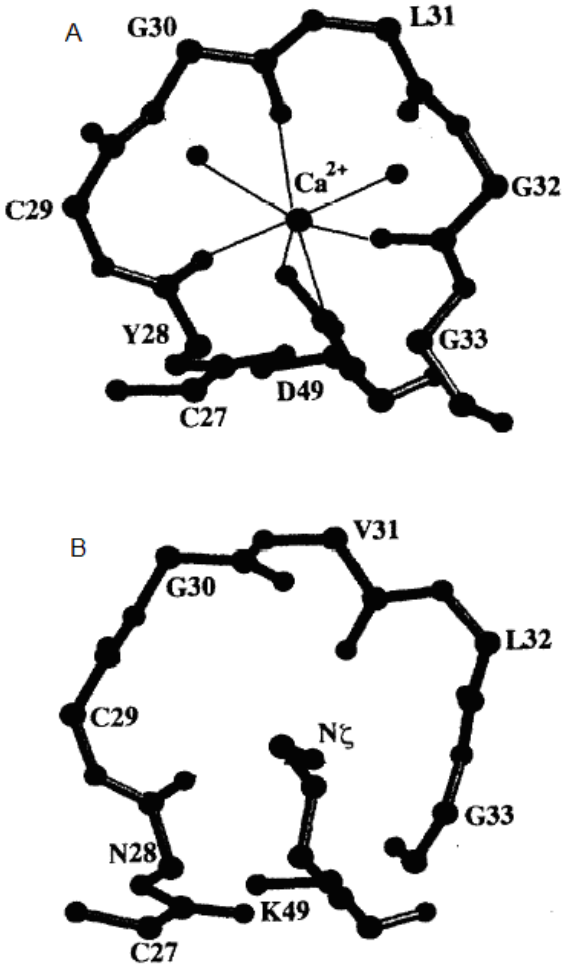

Figura 4. Representação dos resíduos 27-33 e resíduo 49, que compreendem a alça de ligação do cálcio das PLA_2s. (A) Asp49 de *Naja naja atra*, ilustrando que a coordenação pentagonal bipiramidal do Ca^{2+} são realizadas por interações dos átomos de oxigênio carbonil da alça de ligação de cálcio, átomos de oxigênio carbonil da cadeia principal de Asp49 e duas moléculas de água. **(B)** PLA_2 Lys49 de *Bothrops pirajai,* no qual o átomo de Nξ da cadeia lateral de Lys49 ocupa a posição do íon Ca^{2+}, formando pontes de hidrogênio (Adaptado de WARD; de AZEVEDO; ARNI, 1998).

1.3. Inibidores de PLA_2s

As diferentes toxinas de peçonhas podem ser reconhecidas e inibidas por anticorpos monoclonais e/ou policlonais, e também por algumas moléculas de diversas naturezas, incluindo agentes químicos, sintéticos e naturais de origem animal e vegetal (BORGES et al., 2001; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003; SOARES et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; MARCUSSI et al., 2007).

A heparina de baixo peso molecular, um polissacarídeo aniônico natural, mostrou-se eficiente em inibir parcialmente os efeitos miotóxico, citotóxico e edematogênico induzidos pelas miotoxinas MjTX-II de *Bothrops moojeni* e BnSP-7 de *Bothrops neuwiedi*, e totalmente, o bloqueio neuromuscular induzido pela última (SOARES et al., 2000a; b; STÁBELI et al., 2006). Estes dados concordam com a hipótese de que a região C-terminal de 115-129 da miotoxina II de *Bothrops asper*, denominada de região ligante de heparina, seria a responsável pela citotoxicidade e por parte da miotoxicidade causadas por estas moléculas, uma vez que o poliânion heparina interage com esta região na estrutura das PLA_2s (LOMONTE et al., 1994).

O brometo de *p*-bromofenacila (BPB) é considerado um inibidor específico de PLA_2s devido a sua capacidade de modificar covalentemente os resíduos de histidina. A alquilação do resíduo His48 pelo BPB promove a perda total ou parcial da atividade de hidrólise de fosfolipídios e adionalmente pode induzir a diminuição dos efeitos tóxicos (SOARES; GIGLIO, 2003; MAGRO et al., 2005; MARCUSSI et al., 2007).

Além destas substâncias, diversas plantas têm sido relatadas demonstrando ação antiofídica, mostrando a presença de biomoléculas capazes de neutralizar ou inibir parcialmente diversos efeitos locais e sistêmicos induzidos por diferentes peçonhas de serpentes. Sendo assim, pesquisas científicas para isolar e identificar os princípios

ativos estão cada vez mais em evidência (MORS et al., 2000; SOARES et al., 2005; SAMY et al., 2008).

Além da utilização popular, cientificamente há diversas comprovações da eficácia de extratos brutos ou frações de plantas, em experimentos *in vitro* e *in vivo* contra peçonhas de serpentes (SOARES et al., 2005), como por exemplo: erva-botão (*Eclipta prostata*) (MELO et al., 1994; MELO; OWNBY, 1999), guaçatonga (*Casearia sylvestris*) (BORGES et al., 2000; CAVALCANTE et al., 2007), gloriosa (*Gloriosa superba*) (SAMY et al., 2008), erva-baleeira (*Cordia verbenacea*) (TICLI et al., 2005) e pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*) (OLIVEIRA et al., 2005).

Além destes agentes neutralizadores de origem vegetal, existem alguns exemplos de inibidores obtidos do soro de animais como, por exemplo, o complexo antibotrópico (CAB) de *Didelphis albiventris* e *D. marsupialis* (SOARES et al., 1997; TRENTO et al., 2001; ROCHA et al., 2002), e os inibidores isolados de plasma de serpentes (OHKURA et al., 1993; OHKURA et al., 1994a; b; FORTES-DIAZ et al., 1994; PERALES et al., 1995; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003; SOARES et al., 2003).

Diversas revisões com inibidores de hemorraginas (DOMONT; PERALES; MOUSSATCHÉ, 1991; THWIN; GOPALAKRISHNAKONE, 1998; PÉREZ; SÁNCHEZ, 1999) e de miotoxinas e neurotoxinas das peçonhas de serpentes (DOMONT; PERALES; MOUSSATCHÉ, 1991; FAURE, 2000; FORTES-DIAS, 2002) têm sido publicados. Lizano, Domont e Perales (2003) descreveram as proteínas inibidoras de PLA_2s tóxicas derivadas do plasma de serpentes com ênfase particular na classificação, aspectos moleculares e características funcionais destes inibidores.

1.4. Inibidores de PLA_2s isolados de serpentes (PLIs)

Há muitos anos sabe-se que as serpentes são resistentes as suas próprias peçonhas. Esta resistência pode ser explicada pela presença de fatores neutralizantes em seu plasma sanguíneo (OVADIA; KOCHVA, 1977; DOMONT; PERALES; MOUSSATCHÉ, 1991).

Atualmente há descrição de uma série de inibidores existentes no sangue de diversos animais, incluindo fatores neutralizantes de hemorragia, neurotoxicidade, miotoxicidade, atividade PLA_2, entre outros (LIZANO et al., 1997; PÉREZ; SANCHEZ, 1999; SO et al., 2008).

Durante os últimos anos, houve um aumento no número de descrições de inibidores de fosfolipases A_2 de plasma de serpentes (FAURE, 2000; DUNN e BROADY, 2001; FORTES-DIAS, 2002; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003; MARCUSSI et al., 2007).

Estes inibidores protéicos encontram-se no sangue destes animais mesmo antes de uma possível exposição aos componentes da peçonha. São glicoproteínas oligoméricas, globulares e ácidas (OVADIA; KOCHVA, 1977; DOMONT; PERALES; MOUSSATCHÉ, 1991; THWIN; GOPALAKRISHNAKONE, 1998; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003) classificadas com base em suas características estruturais e homologia de sequência com outras proteínas (INOUE et al., 1991; INOUE et al., 1997; OHKURA et al., 1997). Segundo Marcussi et al. (2007) e Lizano, Domont e Perales (2003), estes inibidores de PLA_2s têm sido isolados e caracterizados de plasmas de serpentes dos gêneros *Agkistrodon, Trimeresurus, Bothrops, Crotalus, Naja, Laticaudata* e *Elaphe* (Quadro 1). Os inibidores de PLA_2s

(PLIs) podem ser classificados em três diferentes grupos alfa (α), beta (β), e gama (γ) (THWIN et al., 2002).

Os PLIs do tipo α têm sido encontrados na família Viperidae e Colubridae em diferentes espécies de serpentes tais como *Trimeresurus flavoviridis* (KOGAKI et al., 1989), *Agkistrodon blomhoffii siniticus* (OHKURA et al., 1993), *Bothrops asper* (LIZANO et al., 1997), *Cerrophidion godmani* (LIZANO et al., 2000), *Bothrops moojeni* (SOARES et al., 2003), *Gloydius brevicaudus* (OKUMURA et al., 2005), *Elaphe quadrivirgata* e *E. climacophora* (OKUMURA et al., 2003; SHIRAI et al., 2009), *Atropoides nummifer* (QUIRÓS et al., 2007), *Protobothrops flavoviridis* (SHIMADA et al., 2008) e *Bothrops jararacussu* (OLIVEIRA et al., 2008). Os αPLIs são constituídos por mais de duas subunidades e apresentam uma região de domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) (DRICKAMER, 1988), que está presente em outras proteínas tais como a apoproteína surfactante pulmonar (WHITE et al., 1985), a proteína A ligante de manose de fígado de rato (DRICKAMER; DORDAL; REYNOLDS, 1986) e receptores de PLA_2s de mamíferos (CUPILLARD et al., 1999).

O mecanismo de ação dos αPLIs, que neutralizam os efeitos tóxicos das PLA_2s de peçonhas de serpentes, possivelmente está relacionado com a região DRC, em particular o domínio 5, o qual reconhece e liga-se à enzima, inibindo o efeito catalítico sobre a membrana celular (NICOLAS; LAMBEAU; LAZDUNSKI, 1995; LIZANO et al., 1997; VALENTIN; LAMBEAU, 2000).

Os βPLIs foram isolados das espécies de serpentes *Agkistrodon blomhoffii siniticus* (OKUMURA et al., 1998) e *Elaphe quadrivirgata* e *E. climacophora* (OKUMURA et al., 2002; SHIRAI et al., 2009), as quais pertencem a família Viperidae e Colubridae, respectivamente. Esses inibidores possuem estruturas com

repetições ricas em leucina e demonstram similaridade com a α_2-glicoproteína humana (OKUMURA et al., 1998). Interessantemente, as regiões ricas em leucina têm sido identificadas em diversos tipos de proteínas participando de diferentes funções celulares (KOBE; DEISENHOFER, 1995). Estes achados sugerem a possibilidade desta região particular nas interações proteína-proteína. Ao contrário dos inibidores tipo α, os tipo β, inibem somente as PLA_2s básicas do grupo II isoladas de peçonhas de serpentes (OKUMURA et al., 2002).

Finalmente, os inibidores γPLI foram encontrados em diversas famílias tais como Viperidae, Colubridae, Elapidae, Boiidae e Hydrophiidae, as quais pertencem diferentes espécies de serpentes como a *Laticauda semifasciata* (OHKURA et al., 1999), *Crotalus durissus terrificus* (FORTES-DIAS et al., 1994; PERALES et al., 1995), *Agkistrodon blomhoffii siniticus* (OHKURA et al., 1997), *Trimeresurus flavoviridis* (NOBUHISA et al., 1997), *Elaphe quadrivirgata* e *E. climacophora* (OKUMURA et al., 1999; SHIRAI et al., 2009), *Cerrophidion godmani* (LIZANO et al., 2000), *Naja naja kaouthia* (OHKURA et al., 1994a;b), *Notechis ater* (HAINS et al., 2000), *Notechis ater serventyi* (HAINS; BROADY, 2000), *Notechis scutatus* (HAINS et al., 2001), *Oxyuranus scutellatus* (HAINS; BROADY, 2000), *Oxyuranus microlepidotus* (HAINS; BROADY, 2000), *Pseudonaja textilis* (HAINS; BROADY, 2000), *Python reticulates* (THWIN et al., 2000), *Lachesis muta muta* (FORTES-DIAS et al., 2003), *Vipera ammodytes ammodytes* (SCRIBAR et al., 2007), *Bothrops jararacussu* (OLIVEIRA et al., 2009), *Protobothrops flavoviridis* (SO et al., 2008), *Bothrops alternatus, B. erythromelas, B. jararaca, B. jararacussu, B. moojeni e B. neuwiedi* (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008).

Os γPLIs possuem em comum repetições intramoleculares de domínios ricos em cisteína (OHKURA et al., 1994a; b; NOBUHISA et al., 1997). Esses PLIs são

capazes de ligar-se e inibir diferentes grupos de PLA_2s incluindo os grupos I e II isolados de peçonha de serpentes e o grupo III isolado de peçonha de abelhas (OKUMURA et al., 1999).

As informações sobre a caracterização bioquímica, estrutural e funcional destas glicoprotéinas ácidas poderão auxiliar na melhor compreensão do efeito inibitório sobre a toxicidade das PLA_2s. Adicionalmente, estes estudos poderão gerar discussões sobre o mecanismo de ação, além da aplicabilidade destas moléculas como ferramentas na pesquisa científica e/ou para futuras utilizações terapêuticas.

QUADRO 1. Distribuição de diferentes tipos de PLIs

Classificação	Família	Serpente	Inibidor	Referência
αPLI	Viperidae	*Agkistrodon blomhoffii siniticus*	*Abs*PLIα	OHKURA et al., 1993
		Atropoides nummifer	AnMIP	QUIRÓS et al., 2007
		Bothrops asper	BaMIP	LIZANO et al., 1997
		Bothrops moojeni	BmjMIP	SOARES et al., 2003
		Bothrops jararacussu	αBjussuMIP	OLIVEIRA et al., 2008
		Cerrophidion godmani	CgMIP-II	LIZANO et al., 2000
		Gloydius brevicaudus	GbPLIα	OKUMURA et al., 2005
		Protobothrops flavoviridis	PLIα	SHIMADA et al., 2008
		Trimeresurus flavoviridis	*Tft*PLIα	KOGAKI et al., 1989
	Colubridae	*Elaphe quadrivirgata*	*Eq*PLIα	OKUMURA et al., 2003
		Elaphe climacophora	PLIα	SHIRAI et al., 2009
βPLI	Viperidae	*Agkistrodon blomhoffi siniticus*	PLIβ	OKUMURA et al., 1998
	Colubridae	*Elaphe quadrivirgata*	*Eq*PLIβ	OKUMURA et al., 2002
		Elaphe climacophora	PLIβ	SHIRAI et al., 2009
γPLI	Viperidae	*Agkistrodon blomhoffii siniticus*	PLIγ	OHKURA et al., 1997
		Bothrops alternatus	PLIγ	ESTEVÃO-COSTA et al., 2008
		Bothrops erythromelas		
		Bothrops jararaca		
		Bothrops jararacussu		
		Bothrops moojeni		
		Bothrops neuwiedi		
		Bothrops jararacussu	γBjussuMIP	OLIVEIRA et al., 2009
		Cerrophidion godmani	CgMIP-I	LIZANO et al., 2000
		Crotalus durissus terrificus	CNF	FORTES-DIAS et al., 1994
			CCS	PERALES et al., 1995
		Lachesis muta muta	PLIγ	FORTES-DIAS et al., 2003
		Protobothrops flavoviridis		SO et al., 2008
		Trimeresurus flavoviridis	*Tft*PLIγ	NOBUHISA et al., 1997
	Boiidae	*Phyton reticulates*	PIP	THWIN et al., 2000
	Colubridae	*Elaphe climacophora*	PLIγ	SHIRAI et al., 2009
		Elaphe quadrivirgata	*Eq*PLIγ	OKUMURA et al., 1999
	Hydrophiidae	*Laticauda semifasciata*	*Lsf*PLIγ	OHKURA et al., 1999
	Elapidae	*Naja naja kaouthia*	*Nnk*PLIγ	OHKURA et al., 1994a,b
		Notechis ater	NAI	HAINS et al., 2000
		Notechis ater serventyi	NAsI	HAINS e BROADY, 2000
		Notechis scutatus	NSI	HAINS et al., 2001
		Oxyuranus microlepidotus	OMI	HAINS e BROADY, 2000
		Oxyuranus scutellatus	OSI	HAINS e BROADY, 2000
		Pseudonaja textilis	PTI	HAINS e BROADY, 2000

Objetivos

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da neutralização de fosfolipases A_2 isoladas das peçonhas de *Bothrops jararacussu, Bothrops pirajai* e *Crotalus durissus terrificus* pelos inibidores de PLA_2s (PLIs) do tipo α e γ isolados do plasma de serpente *Bothrops jararacussu*.

2.1. Objetivos específicos

- Isolamento dos inibidores plasmáticos de *B. jararacussu* (BjussuMIPs) dos tipos α e γ;
- Caracterização bioquímica dos BjussuMIPs: SDS-PAGE, focalização, sequenciamento N-terminal e espectrometria de massa.
- Elucidação das propriedades inibitórias dos PLIs: inibição das atividades fosfolipásica, anticoagulante, miotóxica, indução de edema, citotóxica, bactericida e letalidade de diferentes PLA_2s isoladas das peçonhas de serpentes *B. jararacussu* (Lys49-BthTX-I e Asp49-BthTX-II), *B. pirajai* (Lys49-PrTX-I e Asp49-PrTX-III) e *C. d. terrificus* (Asp49-CB).
- Caracterização estrutural: análise da estrutura secundária do PLI tipo α por dicroísmo circular, clonagem molecular, sequenciamento e análise de cDNA obtido por PCR dos α e γ BjussuMIPs.

Material

3. MATERIAL

3.1. Peçonha

Cerca de 1 g das peçonhas de *B. jararacussu, B. pirajai* e *C. d. terrificus* foram adquiridos do serpentário Bioagents, Batatais-SP.

3.2. Animais

Para os ensaios biológicos, foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss* (18 a 22 g) fornecidos pelo biotério central da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto-SP. Os animais foram mantidos agrupados em caixas de polipropileno em temperatura ambiente constante. Um espécime de serpente *B. jararacussu* foi fornecido pelo serpentário 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 nº 05.1.1410.53.5), e com as regras do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Autorização do IBAMA, certificado número 11781-1) (Anexos).

3.3. Plasma humano

Foram utilizados plasmas de voluntários saudáveis doados pelo Hemocentro, de acordo com as normas éticas do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP (CEP) (Certificado nº68) (Anexos).

3.4. Reagentes e Equipamentos

- β-mercaptoetanol (Pharmacia Biotech)
- Acetonitrila (Merck)
- Ácido acético ($C_2H_4O_2$), (Synth)
- Ácido clorídrico (HCl), (Synth)
- Ácido fosfórico (H_3PO_4), (Synth)
- Ácido trifluoracético (TFA), (Merck)
- Acrilamida e Bis-acrilamida (N',N'–metilenobisacrilamida), (Sigma Chem. Co)
- Albumina de soro bovino
- AMICON Modelo 8050 (MILLIPORE)
- Azida sódica (Sigma Chem. Co)
- Azul de bromofenol (Merck)
- Bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3, AMBIC), (Vetec)
- Bomba peristáltica (Pharmacia Biotech)
- Buffalyte (Pierce)
- Carboximetil Sepharose (CM-Sepharose) (Pharmacia Biotech)
- Centrífuga Excelsa II (FANEM)
- Citrato de sódio (Synth)
- Coletor automático (Pharmacia Biotech – RediFrac)
- *Coomassie Brilliant Blue* G-250 (Sigma Chem. Co)
- Diacetilfosfato (Sigma Chem. Co)
- Dodecil sulfato de sódio (SDS), (Pharmacia Biotech)
- *Electrophoresis Power Supply* EPS 601, (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)
- Espectrofotômetro (GENESYS)

- Fosfatidilcolina (Sigma Chem. Co)
- Glicina (Sigma Chem. Co)
- Hidróxido de sódio (NaOH), (Synth)
- HPLC (Shimadzu), coluna C-18
- Kit CK-NAC cinético (BioClin)
- Membrana de ultracentrifugação (MILLIPORE)
- Metanol (Synth)
- N',N',N',N' – tetrametiletilenodiamino (TEMED), (Sigma Chem. Co)
- Padrões de peso molecular para proteínas de M*r* 14.000-96.000 (Sigma)
- Paquímetro de baixa pressão 0,01mm, (Mitutoyo, Japão)
- Persulfato de amônio (Pharmacia Biotech)
- Sacarose (Synth)
- Sepharose 4B CNBr-ativada
- Soro fetal bovino (SFB, Sigma)
- Sulfato de cobre hidratado ($CuSO_4 . 5H_2O$), (Acros Organics)
- Tris-base (Sigma Chem. Co)
- Triton-X/100 (Pharmacia Biotech)

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

Metodologia

4. METODOLOGIA

4.1. Caracterização bioquímica

4.1.1. Isolamento de PLA_2s

Preparo das amostras: Cerca de 200 mg das peçonhas cristalizadas de *B. jararacussu* e *B. pirajai* foram suspensos separadamente em 1,5 mL de tampão bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 0,05 M, pH 8,0 e centrifugados a 1.530*xg,* durante 10 minutos a 4ºC, em centrifuga Excelsa Baby I. Alíquotas do sobrenadante foram retiradas para dosagem de proteínas e monitoramento em espectrofotômetro (Genesys 10UV) a 280 nm, e o restante foi submetido à cromatografia. A fosfolipase A_2 (CB) foi isolada da peçonha de *C. d terrificus* a partir de sua separação do complexo crotoxina. Esta enzima foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. José R. Giglio, FMRP-USP.

Procedimentos cromatográficos: Foi utilizada a cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose conforme descrito por Soares et al. (1998). Amostras de cada peçonha foi aplicada em etapas cromatográficas separadas em colunas contendo resina CM-Sepharose (2,0 cm x 20 cm), equilibrada em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 8,0, e eluídas em mesmo tampão com gradiente de concentração até 1 M. Para tanto, foi utilizado um fluxo de 0,5 mL/min, coletando-se frações de 3,5 mL/tubo. Os picos resultantes desses processos foram avaliados em SDS-PAGE e quanto à atividade enzimática e miotóxica, sendo selecionadas as frações de interesse.

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 280 nm, sendo concentradas, liofilizadas e armazenadas a 4°C.

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

Monitoramento do grau de pureza das PLA_2s: SDS-PAGE foi realizada segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). 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 proteínas foram dissolvidas em salina tamponada em fosfato (PBS), acrescidas de 4 µL de azul de bromofenol (0,01%) e SDS (2%), submetidas à fervura a 100℃ por 4 minutos e aplicadas separadamente nos poços do gel.

Logo após o processo de corrida eletroforética, realizada a 95 V e 15 mA (*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 a 10%. Em seguida, o gel foi documentado em *scanner*.

As proteínas que compõem o padrão de peso molecular utilizado (Sigma) foram: 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 logarítmo do peso molecular do padrão.

4.1.2. Isolamento dos inibidores de PLA_2s (PLIs)

Preparo das amostras: após um espécime da serpente *B. jararacussu* ser sacrificado por processo de decapitação, o sangue foi coletado em tubos contendo citrato de sódio 0,38%, como anticoagulante, e centrifugado a 1530 *xg*. Logo em seguida o plasma obtido foi liofilizado e armazenado a -20ºC. Para acumular mais sangue, este foi coletado da veia da cauda dos animais previamente anestesiados sem necessidade de sacrificá-los.

Procedimentos cromatográficos: foram realizados segundo metodologia descrita por Soares et al. (2003).

Cromatografia de afinidade para o isolamento do αBjussuMIP: O isolamento do inibidor tipo α do plasma sanguíneo de *Bothrops jararacussu* foi realizado do seguinte modo: Cerca de 40 mg de BthTX-I foi acoplada a 10 mL de Sepharose 4B-CNBr ativada como descrito pelo fabricante. Em seguida, a resina foi colocada em uma coluna de vidro de 1,0 x 8,0 centímetros e equilibrada com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2. O plasma de *B. jararacussu* (10 mL) foi diluído em 50 mL do mesmo tampão (50 mL, tampão 1) e aplicado na coluna num fluxo de 2,0 mL/min.

A absorvância foi registrada a 280 nm e a amostra foi recirculada por duas horas seguida por uma lavagem extensa com o mesmo tampão. O inibidor foi eluído com glicina-HCl 0,1 M, pH 2,8 (tampão 2), e o pH da amostra eluída foi imediatamente ajustado para pH 7,0 com Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0. O αBjussuMIP foi dessalinizado e concentrado usando uma membrana Amicon YM-10.000 por sucessivas lavagens com AMBIC 0,05 M, pH 8,0, fracionadas em porções de 1,0 mL, que foram então liofilizadas e armazenadas a -20ºC.

Cromatografia de afinidade do γBjussuMIP: Para o isolamento do inibidor tipo γ do plasma sanguíneo de *B. jararacussu* foi utilizada a metodologia idêntica para a purificação do inibidor tipo α, entretanto, foi realizado a seguinte modificação: Cerca de 40 mg da BthTX-II foi acoplada a 10 mL de Sepharose 4B-CNBr ativada em substituição a BthTX-I .

Avaliação do grau de pureza dos BjussuMIPs por RP-HPLC: Cerca de 1mg das amostras de cada BjussuMIPs foram liofilizadas, dissolvidas separadamente em 150 µL de solução contendo 5% (v/v) acetonitrila e 0,1% (v/v) ácido trifluoracético (TFA), homogeneizadas e centrifugadas a 480 *xg* por 2 minutos, sendo posteriormente submetida a um sistema de HPLC em fase reversa utilizando coluna C18 (4,6 x 100 mm) (Shimadzu), o qual foi equilibrado com solvente A (5% de acetonitrila, 0,1% ácido trifluoroacético), e eluído com um gradiente de concentração de solvente B (60% acetonitrila, 0,1% ácido trifluoroacético) de 0 a 100%, a um fluxo de 1 mL/min durante 110 min. Os picos eluídos foram monitorados por espectrofotômetro em 280 nm.

4.1.3. Caracterização bioquímica dos inibidores de PLA_2 (PLIs)

Determinação do peso molecular dos BjussuMIPs:

Determinação da M*r* para monômero: Foi realizada segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970) citada anteriormente no item 4.1.1.

Neste procedimento foi utilizado padrão de peso molecular (Sigma) contendo as seguintes proteínas: Fosforilase B de músculo de coelho (96.000Da), Albumina bovina (66.000 Da), ovoalbumina (45.000 Da), anidrase carbônica bovina (29.000 Da) e α-lactalbumina de leite bovino (14.000 Da).

Determinação da M*r* para o oligômero: foi empregada a cromatografia de exclusão em Sephacryl S-200 (2,5 x 60 cm), eluída e previamente equilibrada em PBS pH 7,2, utilizando, aldolase (M_r = 158.000), catalase (M_r = 232.000) e ferritina (M_r = 440.000) como marcadores de peso molecular.

Focalização Isoelétrica: O p*I* foi determinado por focalização isoelétrica, segundo o método descrito por Vesterberg (1972). 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 14 cm com espessura de 0,14 cm. Aplicação dos BjussuMIPs e focalização isoelétrica: O gel foi colocado sobre uma placa refrigerada à temperatura de 8℃. 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 1 M. A fonte de alta voltagem foi regulada para valores de 100 V, 40 mA e então realizada uma pré-focalização por 30 minutos. Pedaços de

papel de 1,0 x 0,5 cm foram embebidos nas amostras e colocados sobre o gel, sendo retirados após 60 minutos de focalização em 250 V e 40 mA. A focalização se estendeu por um tempo de aproximadamente 2 horas a 750 V e 40 mA, e por 1 hora e 20 minutos em 150 V e 5 a 0 mA. Este experimento foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Eliane C. Arantes, FCFRP-USP.

Deglicosilação: Os inibidores BjussuMIPs (20 µg) foram deglicosilados por incubação prévia com 100 mU de N-glicosidase F (*Roche Molecular Biochemical*) por 18 h a 37ºC em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, contendo EDTA 0,05 M, em um volume total de reação de 20 µL (SOARES et al., 2003), e em seguida analisado através de eletroforese e testes de verificação da atividade inibitória sobre PLA_2s.

Composição de aminoácidos: Amostras dos BjussuMIPs (0,3 a 0,6 mg/mL) foram previamente hidrolisadas com ácido clorídrico bidestilado a 6 N, em fase gasosa por aproximadamente 20 h (BIDLINGMEYER; COHEN; TRAVIS, 1984), seguido por derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC), e a separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) em HPLC, utilizando coluna de fase reversa C18 (Pico-Tag - 3,9 x 150 mm) com monitoramento em comprimento de onda de 254 nm.

Para quantificar os aminoácidos, determinou-se a área de cada pico, tomando-se como referência a área dos picos dos padrões de aminoácidos com concentração conhecida, sendo que o padrão foi derivado nas mesmas condições e ao mesmo tempo que as amostras.

4.2. Caracterização estrutural dos PLIs

4.2.1. Sequenciamento N-terminal e espectrometria de massa

A região N-terminal da proteína foi determinada pelo método de degradação de Edman em um sequenciador automático PPSQ-33A (Shimadzu) (SOARES et al., 2003). Os aminoácidos phenylthyoidantoina derivados (PTH-aminoácidos) foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos 20 PTH-aminoácidos padrão. O sequenciamento N-terminal e a análise por espectrometria de massa foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Rodrigo G. Stábeli, UNIR-RO. Os estudos de homologia sequencial foram realizados utilizando o banco de dados *SWISS-PROT: Annotated protein sequence database* (http://www.expasy.ch/sprot/).

4.2.2. Dicroísmo circular do αBjussuMIP

Os espectros de dicroísmo circular (190-250 nm) foram mensurados com um JASCO 810 (JASCO Inc., Tokyo, Japão) usando cubeta de 1 mm de comprimento e concentrações de 250 µg/mL para o αBjussuMIP e PLA_2 miotóxica alvo (BthTX-I). No caso das misturas de proteínas, a concentração máxima foi de 500 µg/mL. Um total de 8 espectros foram coletados por teste e os resultados obtidos foram calculados e corrigidos por subtração do branco (SOARES et al., 2003). Os espectros de dicroísmo circular foram expressos em elipticidade. Para estimar as proporções da estrutura secundária de αBjussuMIP, os espectros de dicroísmo circular foram avaliados por programas de computadores SOPMA (*self optimized prediction*

method from multiple alignment, http://www.ibcp.fr) e SSpro (*secondary structure*, http://scratch.proteomics.ics.uci.edu).

4.2.3. Clonagem de cDNA e sequenciamento

Cerca de 50 mg de fígado de um espécime adulto de *B. jararacussu* foi homogeneizado em 1,0 mL de Trizol LS (Gibco-Brl) até ser completamente solubilizado, e o RNA total foi obtido conforme descrito pelo fabricante. Posteriormente, 4 µg do RNA total foi utilizado então para a síntese da primeira fita do cDNA dos inibidores das miotoxinas, na presença de 5 U de transcriptase reversa (Mu-MLV) e oligo(dT) por um período de 1 h a 37ºC. A segunda fita de cDNA foi sintetizada usando 2,0 µL da reação descrita acima combinado com os *primers* específicos para amplificar o gene de cada tipo de inibidor α e γ. Os *primers* usados foram: αBjussuMIP-F (5'-tgtacaggtttaaagatg-3') e αBjussuMIP-R (5'-catgcaggtcttccttc-3'), enquanto que para o gama foram: γBjussuMIP-F (5'-atcctcactaaagagcca-3') e γBjussuMIP-R (5'-ggatgaaattgctgacct-3'). Estes *primers* foram desenhados baseando-se na sequência N-terminal dos PLIs, obtidos por sequenciamento direto e outras sequências de PLIs, previamente depositadas no banco de dados do NCBI. Para o procedimento de PCR, as condições utilizadas foram: 95℃/3 min, 94℃/30 seg, 55℃/30 seg, e 72℃/30 seg (25 ciclos) e 72℃/ 10 minutos. O resultado da amplificação do fragmento de DNA obtido foi analisado a 1,5% (m/v) em gel de agarose, purificado, e tratado com T4 DNA polimerase. Após fosforilação, o fragmento foi ligado ao vetor pUC18/*SmaI* (Pharmacia Biotech.). A construção pUC18-MIP (inibidores de miotoxinas) foram amplificados em células competentes de *Escherichia coli* DH5α. Em seguida, foi preparado o DNA plasmidial. O Tamanho do inserto (cDNA) foi avaliado em gel de agarose a 1% após clivagem do plasmídeo

com enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. Para o sequenciamento do cDNA, foi utilizada a técnica do término do crescimento da cadeia. A reação de sequenciamento foi utilizada essencialmente como descrito pelo fabricante para o ciclo de sequenciamento produzido pela enzima *Thermo Sequenase DNA polimerase* em um sequenciador automatizado *ALF Express* (Amersham-Pharmacia). As sequências de aminoácidos de BjussuMIPs foram alinhadas com sequencias disponíveis nas bases de dados GenBank e SwissProt usando o programa Clustal W 1.8 (SOARES et al., 2003).

4.2.4. Predição de estruturas

As estruturas dos BjussuMIPs foram preditas usando três programas: SOPMA (*self optimized prediction method from multiple alignment*, http://www.ibcp.fr), PHD (*Profile network from HeiDelberg*, http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein) e HHpred (*Max-Planck Institute for Developmental Biology server*, http://protevo.eb.tuebingen.mpg.de/toolkit). A sequência foi comparada com outras proteínas de bancos de dados disponíveis online, usando o algorítimo FASTA para identificar proteínas homólogas. Alinhamentos múltiplos foram realizados usando o programa Clustal W 1.8 (SOARES et al., 2003).

Para a identificação do sítio de fosforilação dos PLIs e determinação do "*codon usage"* foram utilizados programas *Gene runner* e SMS (*Sequence Manipulation Suite,* http://bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html), respectivamente.

4.3. Avaliação do efeito inibidor de BjussuMIPs sobre atividades biológicas de PLA_2s de peçonhas de serpentes

Os ensaios de inibição foram feitos com incubação prévia de diferentes proporções dos inibidores e das PLA_2s por 30 minutos a 37ºC. Para calcular a razão molar entre os monômeros de PLA_2s e PLIs, foram considerados os seguintes M*r*s para PLA_2s (13.500), αBjussuMIP (24.000) e γBjussuMIP (23.500).

4.3.1. Inibição da atividade fosfolipásica indireta

Efeito da temperatura e pH sobre os inibidores: a estabilidade dos BjussuMPs foi avaliada por incubação prévia (100 µg) em diferentes valores de pH (2; 4; 6; 7,4; 8; 10 e 12) por 30 minutos a 37ºC com BthTX-II (30 µg) e temperatura (4, 25, 37, 60, 80 e 100ºC). As amostras previamente incubadas foram então avaliadas quanto à atividade fosfolipásica.

Inibição da atividade fosfolipásica: a capacidade dos BjussuMIPs em inibir a atividade enzimática das PLA_2s básicas Asp49 BthTX-II, PrTX-III e CB foi avaliada por incubação prévia por período de 30 minutos a 37ºC destas toxinas com os inibidores em diferentes proporções [0,2 a 0,8 mol/mol (BjussuMIPs/PLA_2)].

A atividade fosfolipásica foi testada pelo método de hemólise radial indireta, realizado em placas. Neste método, descrito por Gutiérrez et al. (1988), um gel é elaborado contendo $CaCl_2$ 0,01 M, gema de ovo em PBS 1:3 v/v, pH 7,2, eritrócitos em PBS 1:3 v/v, ágar bacteriológico a 1% e azida de sódio a 0,05%, e o volume final é completado com PBS. Após a solidificação do gel, orifícios de tamanho uniforme (0,5 cm de diâmetro) são feitos e as amostras aplicadas. As amostras previamente incubadas foram preparadas em volume final de 40 µL.

Os géis utilizados foram mantidos em estufa a 37ºC por 12 horas. A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel foi o indicativo de atividade. Posteriormente, os halos foram medidos em milímetros para a quantificação da atividade fosfolipásica.

O sangue humano cedido por voluntários saudáveis do nosso laboratório, foi diluído em tampão PBS (30 mL) e as células lavadas 3 vezes em centrífuga (400 *xg* por 10 minutos), para volumes aproximados de 10 mL de sangue. Logo em seguida, o plasma e o PBS foram desprezados e os eritrócitos foram utilizados na composição do gel.

4.3.2. Inibição da atividade anticoagulante

A atividade anticoagulante foi realizada de acordo com o método previamente descrito (ALVARADO; GUTIÉRREZ, 1988), utilizando plasma humano citratado. Para o ensaio, o plasma foi descongelado e mantido incubado a 37℃. Os BjussuMIPs foram avaliados quanto à capacidade de inibição desta atividade através de prévia incubação com as PLA_2s (BthTX-II, PrTX-III e CB), em diferentes proporções [0,2 a 1,0 mol/mol (BjussuMIPs/PLA_2)]. Amostras previamente incubadas foram adicionadas a 200 µL de plasma citratado por 1 a 10 min a 37ºC sendo posteriormente adicionados 25 µL de solução de cloreto de cálcio (0,25 mM), cronometrando-se o tempo de coagulação em minutos.

4.3.3. Inibição da atividade miotóxica

A atividade miotóxica foi avaliada mensurando os níveis de creatina cinase em plasma de camundongos (n=6) após injeção intramuscular (i.m.) no músculo gastrocnêmio. Foram utilizados 45 µg de miotoxinas, Asp49 ou Lys49 previamente incubadas com α ou γBjussuMIP em diferentes proporções [0,2 a 1,0 mol/mol (BjussuMIPs/PLA_2)]. Os controles negativos receberam injeção contendo somente os inibidores ou PBS em volume final de 50 µL e os controles positivos foram injetados apenas com as toxinas. Três horas após as injeções, alíquotas do sangue dos camundongos foram coletadas, pela veia da cauda, em capilares heparinizados e imediatamente centrifugadas por 20 minutos 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 minutos a 37ºC, através de leituras em espectrofotômetro a 340 nm. O princípio deste método consiste na reação da creatina fosfato e a adenosina fosfato (ADP), catalisada pela enzima creatina cinase, formando creatina e adenosina trifosfato (ATP). O ATP formado é utilizado para fosforilar glicose, produzindo glicose-6-fosfato (G-6-P) na presença da hexoquinase, a glicose-6-P é então oxidada a gluconolactona-6-fosfato na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ($NADP^+$), sendo esta reação catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase. Na última reação descrita o $NADP^+$ é reduzido a NADPH aumentando a absorbância aferida em comprimento de onda de 340 nm. 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 (STÁBELI et al., 2006).

4.3.4. Inibição do edema

A inibição do edema induzido pelas miotoxinas Asp49 e Lys49 por αBjussuMIP ou γBjussuMIP foi avaliada por injeção de PLA_2s previamente incubadas com os inibidores em diferentes proporções [0,2 a 1,0 mol/mol (BjussuMIPs/PLA_2)], na região subplantar da pata de camundongos machos Swiss (n=6). Os controles foram realizados com injeção das toxinas, inibidores ou PBS isoladamente, em volume final de 50 µL. A atividade de indução de edema foi expressa em porcentagem de aumento da pata calculada a partir de valores obtidos 30 minutos após a injeção. Os valores foram mensurados por paquímetro de baixa pressão de 0,01 mm (Mytutoyo, Japan). Os valores de medidas das patas obtidos no tempo zero foram subtraídos dos valores obtidos 30 minutos após a injeção e as diferenças foram expressas pela média ± DP (STÁBELI et al., 2006).

4.3.5. Inibição da atividade citotóxica

A citotoxicidade induzida pelas miotoxinas (20 µg) na presença ou ausência do αBjussuMIP ou γBjussuMIP em diferentes proporções [0,2 a 1,0 mol/mol (BjussuMIPs/PLA_2)], foi determinada sobre células endoteliais (tEnd) segundo o método previamente descrito (LOMONTE et al., 1999; ANGULO et al., 2001). As células foram cultivadas em frascos de 25 cm^2 em meio Dulbecco (DMEM, Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Sigma), 2 mM de glutamina, 1mM de ácido pirúvico, 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina, em uma atmosfera úmida com 7% de CO_2 a 37ºC. Quando os cultivos alcançaram uma monocapa confluente adicionou-se tripsina (1500 U/mL) com 5,3 mM de EDTA por 5

minutos a 37ºC e as células foram subcultivadas em placas de 96 poços a uma densidade inicial de aproximadamente 1-4 x 10^4 células/poço. Novamente, quando se alcançou uma nova monocapa quase confluente, eliminou-se o meio de cultivo e foram adicionadas diferentes concentrações (µg/poço) das toxinas em um volume final de 150 µL de meio DMEM com 1% de SFB. Para se estabelecer 100% de citotoxicidade sobre as células, estas foram incubadas com 150 µL de Triton X-100 a 0,1% em meio de cultivo e para 0% de citotoxicidade utilizou-se somente os inibidores ou somente meio. Após um período de incubação de 3 horas a 37ºC, alíquotas de 100 µL dos sobrenadantes das células foram utilizadas para determinação da atividade da enzima desidrogenase láctica (DHL) usando o kit colorimétrico da Sigma Chem Co. (Sigma 500). Os resultados foram expressos como porcentagem de citotoxicidade em relação à liberação da enzima produzida na presença do detergente. Esta atividade foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Bruno Lomonte, ICP, Universidade de Costa Rica.

4.3.6. Inibição da atividade bactericida

A capacidade dos BjussuMIPs em inibir a atividade bactericida de miotoxinas Asp49 (BthTX-II) e Lys49 (BthTX-I e PrTX-I) contra *E. coli* (ATCC 29648) foi avaliada como descrito anteriormente (SOARES et al., 2000; 2001). Bactérias *Escherichia coli* (ATCC 29648) foram dispersas em tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,4 contendo peptona 1%. Estas bactérias foram plaqueadas em meio ágar sólido e ajustadas para 4 x 10^7 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL para serem utilizadas para determinação da atividade bactericida. As toxinas foram incubadas com 4 x 10^7 células de 30-60 minutos a 37ºC, juntamente com o inibidor tipo α ou γ em diferentes

proporções [0,2 a 1,0 mol/mol (BjussuMIPs/PLA_2)]. A sobrevida das bactérias foi determinada pela técnica de diluição em placa conforme previamente descrito (PÁRAMO et al., 1998; SOARES et al., 2000b; 2001).

4.3.7. Inibição da letalidade

Para testar o efeito inibidor dos BjussuMIPs sobre a toxicidade (i.p.) induzida pelas miotoxinas isoladas, cerca de 2 DL_{50} 6mg/Kg (Asp49) e 7mg/Kg (Lys49) das toxinas foram previamente incubadas com os inibidores em diferentes proporções [0,2; a 1,0 mol/mol (BjussuMIPs/PLA_2s) e aplicadas por injeção intra-peritoneal (i.p.) em volume final de 100 µL. Os devidos controles isolados (PBS, BjussuMIPs, PLA_2s) foram realizados. A sobrevida dos camundongos (n=6) foi analisada por período de 24 horas após a inoculação das amostras (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; SOARES et al., 2003).

4.4. Avaliação da potencialidade de ação dos BjussuMIPs na suplementação do soro antibotrópico

O inibidor α e/ou inibidor γ foram adicionados ao antiveneno polivalente comercial (Instituto Butantan), utilizado em uma dose efetiva capaz de neutralizar 50% (DE_{50}) da miotoxicidade. A peçonha de *B. jararacussu*, que foi previamente incubado com soro suplementado com diferentes concentraçõs dos inibidores (65, 130 e 260 µg/µL) em um volume final de 50 µL por 30 minutos a 37ºC, foi utilzado em testes de miotoxicidade para averiguar a eficácia do soro suplementado. Os resultados de miotoxicidade obtidos após injeção de soro antibotrópico e

BjussuMIPs e peçonha foram aplicados isoladamente e utlizados como controle (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003; TICLI et al., 2005).

4.5. Análise estatística dos resultados

Os resultados foram expressos pela média +/- desvio padrão (DP). A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste *t-student* com valor $p < 0,05$ considerado, como significante.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento das Fosfolipases A_2 das peçonhas de *B. jararacussu, B. pirajai* e *C. d. terrificus* e determinação de seus pesos moleculares.

Os fracionamentos das peçonhas do gênero *Bothrops* foram realizados separadamente em cromatografia de troca iônica em resina de CM-Sepharose pH 8,0, demonstrando a presença de diferentes miotoxinas BthTX-I e II de *B. jararacussu,* PrTX-I e III de *B. pirajai* (Figura 5). A PLA_2 (CB) como dito anteriormente na metodologia foi cedida pelo Prof. Dr. José R. Giglio, FMRP-USP.

A Figura 5C mostra que as PLA_2s isoladas apresentam M*r* de 13.500 na presença de redutores, podendo ser visualizado o grau de pureza destas enzimas isoladas das peçonhas das serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*.

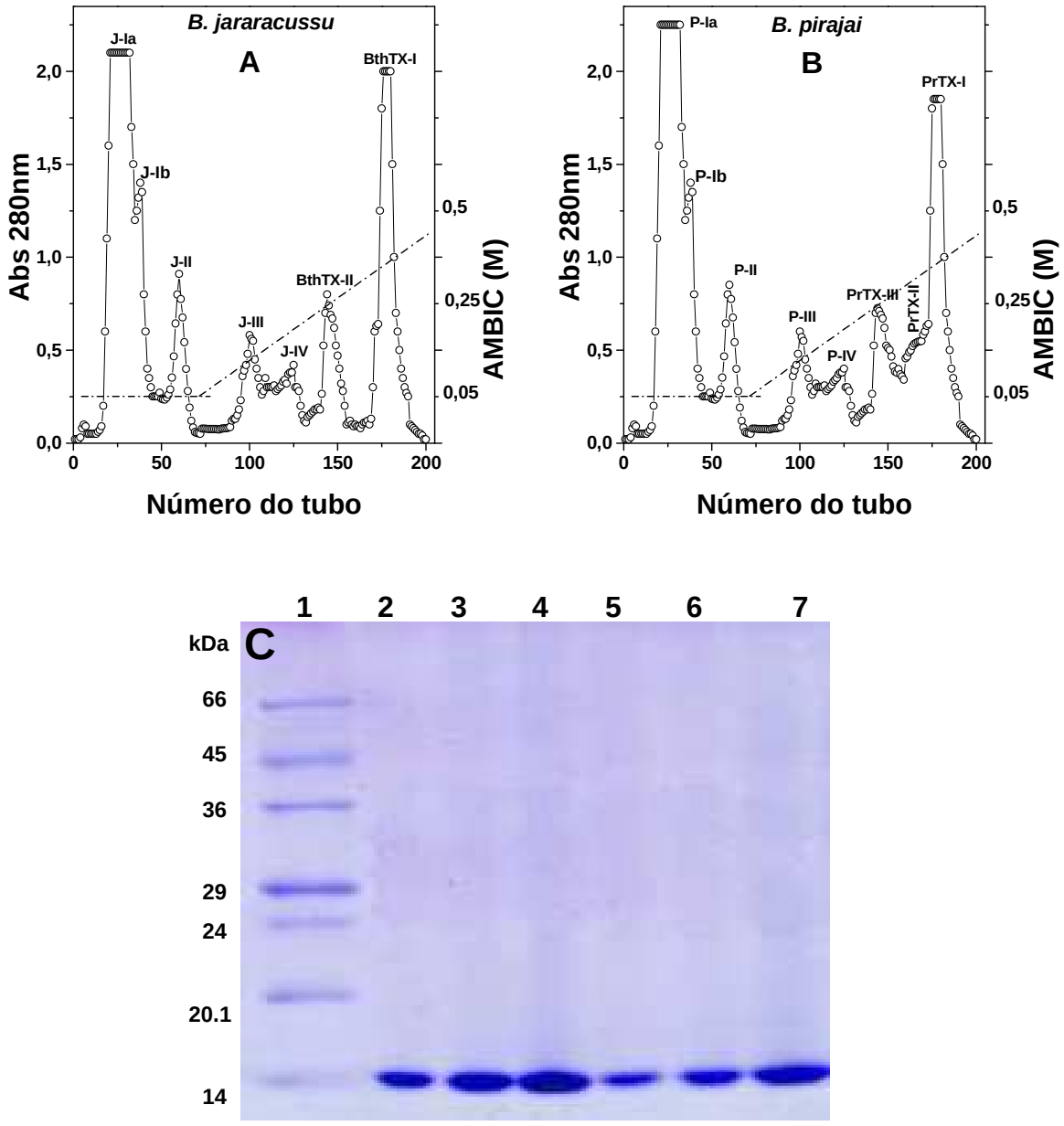

Figura 5. Cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose das PLA_2s. Cromatografia equilibrada em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH 8,0. 200 mg das diferentes peçonhas foram aplicadas em coluna (20 X 2,0 cm): **(A)** *B. jararacussu*; **(B)** *B. pirajai*. As amostras foram eluídas a partir de gradiente contínuo com tampão bicarbonato de amônio (0,05-1,0 M), a um fluxo de 0,5 mL/min, coletando-se frações de 3,5 mL/tubo a temperatura ambiente e as absorbâncias lidas a 280 nm. **(C)** Análise eletroforética para verificação do grau de pureza das fosfolipases A_2 isoladas das peçonhas de *B. jararacussu, B. pirajai* e *C. d. terrificus* em SDS-PAGE a 12%. Amostras: 1-PPM; 2-BthTX-I (15 µg); 3-BthTX-II (15 µg); 4-PrTX-I (15 µg); 5-PrTX-II (15 µg); 6-PrTX-III (15 µg); 7-PLA_2 CB (15 µg).

5.2. Isolamento e caracterização bioquímica dos inibidores de PLA_2s (PLIs)

Os métodos de purificação para os dois BjussuMIPs foram similares, havendo apenas uma diferença no processo: para o isolamento do inibidor tipo α foi necessário acoplar a Lys49-BthTX-I com à resina utilizada, enquanto que para isolar o tipo γ utilizou-se a Asp49-BthTX-II acoplada.

As frações obtidas da resina de afinidade Miotoxina-Sepharose, correspondentes aos picos dos inibidores (BjussuMIPs), eluídas em glicina-HCl 0,1 M, pH 2,8 (Figura 6A e 6C), após o processo de purificação, foram dessalinizadas e concentradas em sistema de ultrafiltração AMICON, usando membrana de 10.000.

O alto grau de pureza dos inibidores foi confirmado em RP-HPLC (Figura 6B e 6D) e em eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS apresentaram bandas únicas com massas moleculares relativas para os monômeros de aproximadamente 24.000 (αBjussuMIP) e 23.500 (γBjussuMIP) (Figura 7A). A análise destes inibidores em cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200, em condições nativas, demonstrou um peso molecular aparente para os oligômeros de 120.000 (αBjussuMIP) e 160.000 (γBjussuMIP) (Figura 7B) O ponto isoelétrico dos BjussuMIPs foram próximos de 5,0 (αBjussuMIP) e 5,5 (γBjussuMIP) (Figura 7C).

A análise de composição de aminoácidos mostrou um alto conteúdo de resíduos de alanina, glutamina e leucina para o αBjussuMIP e uma grande quantidade de resíduos de cisteína e serina foi observado para o inibidor γBjussuMIP (Tabela 1).

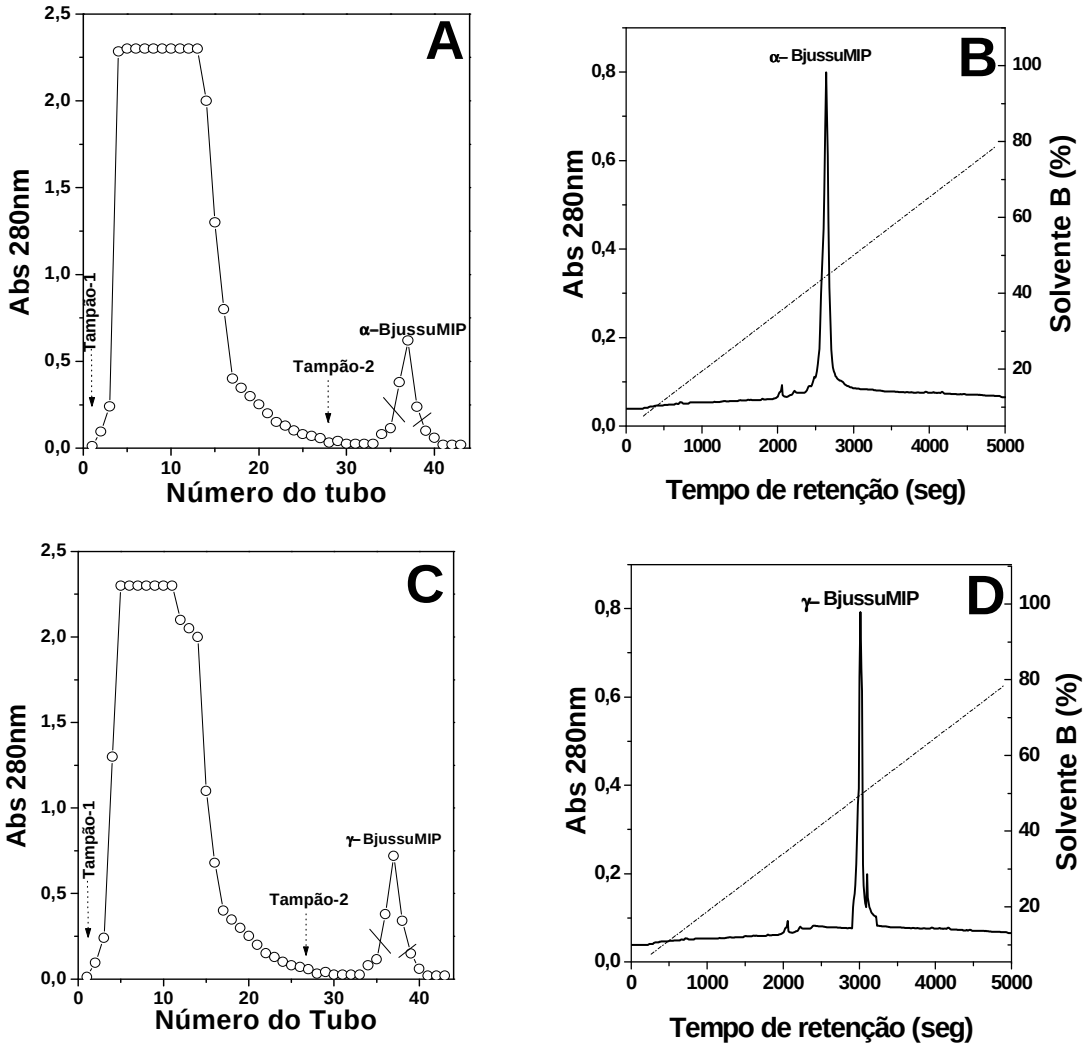

Figura 6. Processos de purificação dos BjussuMIPs: (A) A purificação do inibidor tipo α foi realizada em cromatografia de afinidade BthTX-I-Sepharose. O plasma de *B. jararacussu* (10 mL) foi diluído em 50 mL do mesmo tampão (tampão 1) e aplicado na coluna num fluxo de 2,0 mL/min. O inibidor foi eluído com glicina-HCl 0,1 M, pH 2,8 (tampão 2). **(B)** Avaliação do grau de pureza do αBjussuMIP em RP-HPLC em coluna C18, eluída com um gradiente de concentração de solvente B (60% acetonitrila, 0,1% ácido trifluoroacético). **(C)** A purificação do inibidor tipo γ também foi realizada em cromatografia de afinidade BthTX-II-Sepharose. O plasma de *B. jararacussu* (10 mL) foi diluído em 50 mL do mesmo tampão (tampão 1) e aplicado na coluna num fluxo de 2,0 mL/minuto**.** O inibidor foi eluído com glicina-HCl 0,1 M, pH 2,8 (tampão 2). **(D)** Avaliação do grau de pureza do γBjussuMIP em RP-HPLC em coluna C18, eluída com um gradiente de concentração de solvente B (60% acetonitrila, 0,1% ácido trifluoroacético).

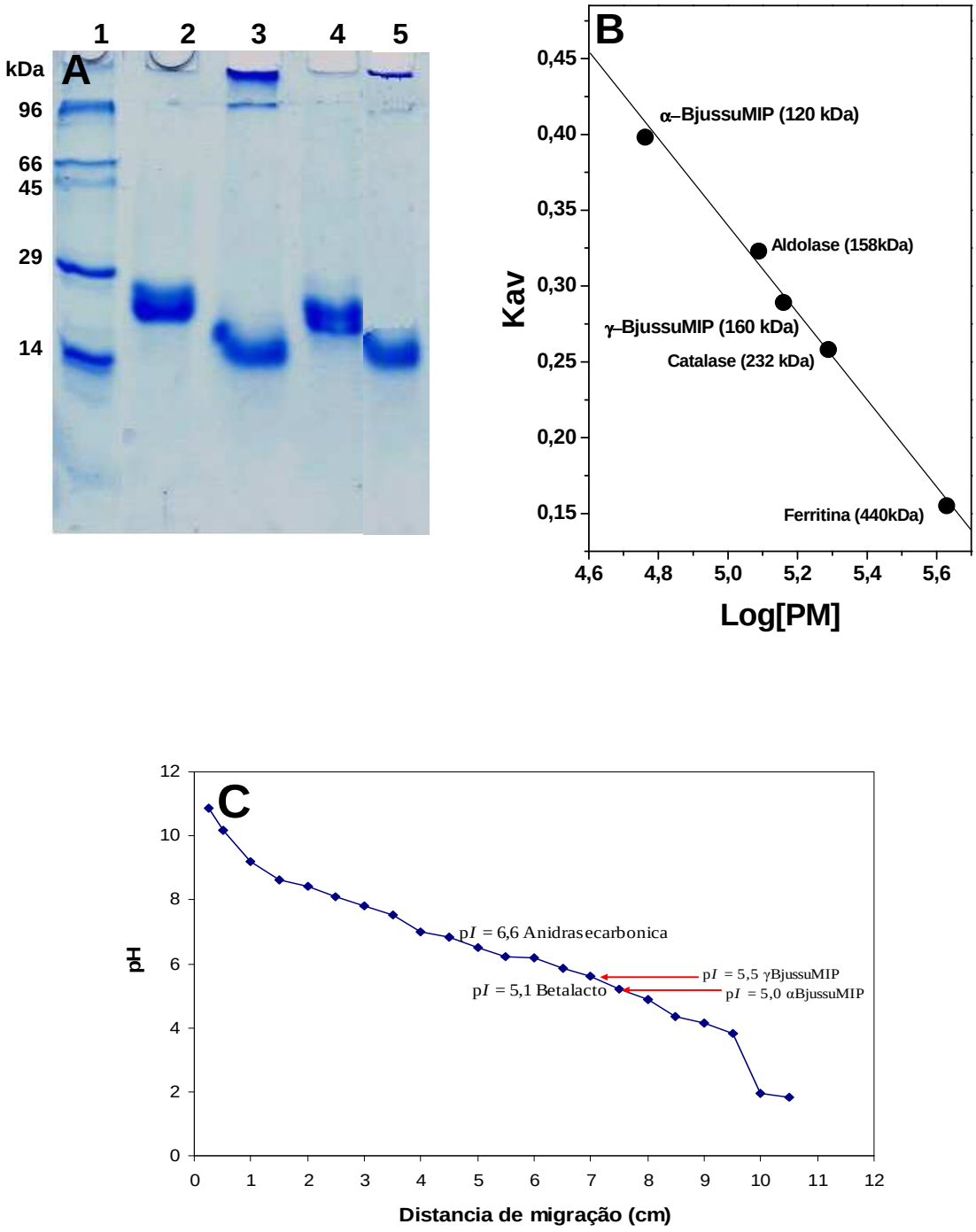

Figura 7. (A) Determinação das massas moleculares relativas dos BjussuMIPs por SDS-PAGE: Linhas: 1- M*r* (96.000; 66.000; 45.000; 29.000 e 14.000); 2- αBjussuMIP (15 µg) ($M_r \cong$ 24.000); 3- deglicosilação de αBjussuMIP (15 µg) ($M_r \cong$ 18.000); 4- γBjussuMIP (15 µg) ($M_r \cong$ 23.500); 5- deglicosilação de γBjussuMIP (15 µg) ($M_r \cong$ 18.000). **(B) Determinação da massas moleculares dos BjussuMIPs por filtração em gel:** As massas moleculares dos inibidores foram estimadas em relação à curva de calibração com proteínas padrão. O coeficiente de eluição (K_{av}) foi determinado pela equação: $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o)$, onde V_e = volume de eluição, V_o = volume inicial e V_t = volume da coluna. **(C) Curva padrão para determinação do p*I* dos inibidores.** Eletrofocalização através de sistema eletroforese Bi-dimensional em gel de poliacrilamida a 5%. Escala de pHs de 2-12.

Tabela 1. Composição em aminoácidos dos inibidores plasmáticos BjussuMIPs

Aminoácidos	αBjussuMIP		γBjussuMIP	
	N° de resíduos (mol/mol)	**(%)**	**N° de resíduos (mol/mol)**	**(%)**
Ala (A)	14,23 (14)	9,5	6,93 (7)	3,9
Arg (R)	5,78 (6)	4,1	6,85 (7)	3,9
Asn (N)	11,06 (11)	7,5	11,05 (11)	6,1
Asp (D)	6,78 (7)	4,8	8,15 (8)	4,4
Cys (C)	4,05 (4)	2,7	16,35 (16)	8,8
Gln (Q)	3,95 (4)	2,7	3,28 (3)	1,7
Glu (E)	12,88 (13)	8,8	15,90 (16)	8,8
Gly (G)	10,22 (10)	6,8	14,45 (14)	7,7
His (H)	4,05 (4)	2,7	8,36 (8)	4,4
Ile (I)	3,78 (4)	2,7	12,89 (13)	7,2
Leu (L)	13,07 (13)	8,8	13,08 (13)	7,2
Lys (K)	7,33 (7)	4,8	10,92 (11)	6,1
Met (M)	1,05 (1)	0,7	0,13 (0)	0,0
Phe (F)	8,40 (8)	5,4	6,33 (6)	3,3
Pro (P)	4,89 (5)	3,4	9,44 (9)	5,0
Ser (S)	11,02 (11)	7,5	19,06 (19)	10,5
Thr (T)	4,05 (4)	2,7	4,78 (5)	2,8
Trp (W)	2,14 (2)	1,4	0,11 (0)	0,0
Tyr (Y)	3,89 (4)	2,7	7,29 (7)	3,9
Val (V)	11,88 (12)	8,2	8,18 (8)	4,4
Total	(144)		(181)	
	αBjussuMIP		**γBjussuMIP**	
% teórica de carboidrato	**33,61**		**35,32**	
PM teórico da proteína	**16.265**		**19.985**	
M*r*	**24.000**		**23.500**	

5.3. Caracterização estrutural dos PLIs

5.3.1. PLI do tipo α

5.3.1.1. Dicroísmo circular

Os resultados da análise por dicroísmo circular para a mistura de αBjussuMIP e BthTX-I revelaram que o espectro da mistura é igual à soma dos espectros individuais de cada proteína, além de demonstrar a existência de 44% de α-hélice, 18% de folhas β, 10% de voltas β e 28% de estruturas aleatórias (Figura 8).

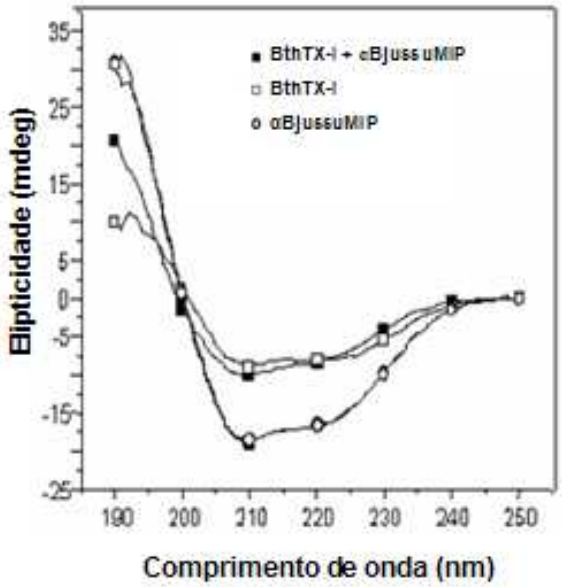

Figura 8. Espectros de dicroísmo circular do αBjussuMIP em associação com Lys49-BthTX-I. BthTX-I ($M_r \cong 13.500$) e/ou αBjussuMIP ($M_r \cong 24.000$) isolados ou associados na proporção molar de 1:1.

5.3.1.2. Caracterização molecular do inibidor tipo α

Através da extração do fígado da serpente *Bothrops jararacussu* obtendo-se o RNA total que somado a oligonucleotídeos específicos para ampliação do gene do αBjussuMIP, resultou na obtenção do cDNA completo com 432 pb, codificando uma proteína madura com 144 αBjussuMIP resíduos de aminoácidos (Figura 9). Diversos clones com insertos do mesmo tamanho foram sequenciados e mostraram sequências idênticas de nucleotídeos. Os primeiros 21 resíduos de aminoácidos da região N-terminal e cinco peptídeos trípticos foram caracterizados por espectrometria de massa, a partir da proteína madura e confirmada pela sequência de nucleotídeos (Tabela 2).

O alinhamento do αBjussuMIP com outros inibidores de serpentes do tipo α demonstrou uma similaridade entre as sequências de 73-92% (Figura 10). A partir da sequência deduzida de aminoácidos correspondente ao αBjussuMIP, as estruturas 2D e 3D foram preditas. Um total de três programas foram utilizados, dos quais uma predição consenso (Figura 11A) e um modelo de estrutura tridimensional (Figura 11B) do αBjussuMIP foram gerados. A análise estrutural mostrou a presença de sitios de fosforilação (S9; S39; T47; S82 e S129) no αBjussuMIP quando comparado com outros αPLIs de serpentes (Tabela 3). As possíveis trincas de bases codificadoras de aminoácidos (*codon usage*) do αBjussuMIP e outros αPLIs foram elaboradas a partir da comparação das sequências de nucleotídeos (Tabela 4).

```
1   ctagcaaatggagatgaggtagacccagatggacacgtactaaacagtcttattgagaca  60
1   L  A  N  G  D  E  V  D  P  D  G  H  V  L  N  S  L  I  E  T    20
61  gtaatgagactgcagagagaatttgcaaatttaaagtacgcattcttaacagtacataaa  120
21  V  M  R  L  Q  R  E  F  A  N  L  K  Y  A  F  L  T  V  H  K    40
121 gcaagaagtttcggtagtgggagtgagagattgtatgtaaccaacaaagaagtgaagaat  180
41  A  R  S  F  G  S  G  S  E  R  L  Y  V  T  N  K  E  V  K  N    60
181 tttgaaccattaggcgaaatctgctcccaagctggtggcagaataccatcaccccagtta  240
61  F  E  P  L  G  E  I  C  S  Q  A  G  G  R  I  P  S  P  Q  L    80
241 gaaaatcaaaataaagcatttgcaagtgtgctcgaaagacataacaaggccgcatacctt  300
81  E  N  Q  N  K  A  F  A  S  V  L  E  R  H  N  K  A  A  Y  L    100
301 gtagtaggagatagtgcgaacttcacgaattgggcggcaggtgaaccgaacgaagctgat  360
101 V  V  G  D  S  A  N  F  T  N  W  A  A  G  E  P  N  E  A  D    120
361 ggaacctgtgttaaagcagatacacacggaagttggcacagtgccagttgcgacgagaat  420
121 G  T  C  V  K  A  D  T  H  G  S  W  H  S  A  S  C  D  E  N    140
421 ttgctagtggtctgtgaattttattttatattgtga                          456
141 L  L  V  V  C  E  F  Y  F  I  L                               151
```

Figura 9. cDNA e sequência de aminoácidos de αBjussuMIP. Sequência de cDNA (1-456 nucleotídeos) foi obtida do RNA total isolado a partir do fígado, por amplificação de produtos de PCR usando oligonucleotídeos específicos. Os aminoácidos sublinhados correspondem ao N-terminal e peptídeos internos de αBjussuMIP. A cadeia de polipeptídio madura mostra 144 resíduos de aminoácidos.

```
                        1                         30                        60
alpha-BjussuMIP         DPDGHVLNSLIETVMRLQREFANLKYAFLTVHKARSFGSGSERLYVTNKEVKNFEPLGEICSQAGGRIPSPQLENQNK
B. moojeni              DPDGQVLNSLIETLMHLQREFANLKYAFLTVHKARSFGSGSERLYVSNKEIKNFEPLGDICSQAGGHIPSPQLENQNK
G. blomhoffii           DPDGHVLNSLMLIVMRLQREFSNLKDGFLTVHKARSFGSGSERLYVTNKEVGNFEGLGEICRQAGGRIPSPQLKNQNK
T. flavoviridis         DPDGQVMSSMIETLMFLQKEYANLRYAFMTVNNARSFGSGSERLYVSNKEIKTFEPLKEICEEAGGHIPSPQLENQNK
A. nummifer             DSDVQMLNSMIEAVMILQRDFANLRYAFMTVHNARSFGGGSERLYVTNKEVSKFEGLEEICSQAGGHIPSPQLENQNK
B. erythromelas         DPDGKVLNSLIDALMHLQREFAKLRGAFLTVYKARSFGNGSERLYVTNKEIKNFEALRQICEQAGGHIPSPQLENQNK
B. neuwiedi             DPDRKLLNSLIDALMHLQREFANLKGSFLIVHKARSFGSGSERMYVTNKEIKNFEALRQICEQADGHIPSPQLENQNK
B. jararaca             DPDGKVLNSLIDALMHLQREFANLRGAFLTVHKARSFGSGSERLYVTNKEIKNFEALRQICEQAEGHIPSPQLENHNK
B. alternatus           DPDGKLLNSLIDALMHLQREFAKLRGAFLTVYKARSFGNGSERLYVTNKEIKNFEALRQICEQAGGHIPSPQLENQNK
B. jararacussu          DPDRKLLNSLIDALMHLQREFANLKGSFLIVHKARSFGSGSERMYVTNKEIKNFEALRQICEQADGHIPSPQLENQNK
C. d. terrificus        DPEGEVLNSVLLTLMKLQKEFTNLFHAFLTVHKARSFGSGSERLYVSNKEIKNFEALKVICKQAGGQIPSPQLENQNK
E. quadrivirgata        DPEGQILNSLVETVGRLEKKIDKVENAFLTVHRARSFGSGSERLYVTNKQVGNFEAVRNTCVQAGGHIPSPQLLNENK
                        *.: .:::.*::  :  *::.  ::  .*: * .*****.****:**:**:: .** :   * :* *:****** *.**

                        79                100                         130
                                                                                          Identidade (%)
alpha-BjussuMIP         AFASVLERHNKAAYLVVGDSANFTNWAAGEPNEADG--TCVKADTHGSWHSASCDENLLVVCEFYFIL   100
B. moojeni              AFANVLERHNKAAYLVVGDSANFTNWAAGQPNEADG--TCVKADTHGSWHSASCDDNLLVVCEFYFIL    92
G. blomhoffii           AFANVLERHNKEAYLVVGNSANFTNWAEGQPKKADG--TCVKADTHGFWHSTSCDDNLLVVCEFYFIL    85
T. flavoviridis         AFASVLERHNKAAYLVVGDSANFTNWAAGQPNEADG--TCVKADTHGSWHSASCDENLLVVCEFYFIL    85
A. nummifer             AFEDVLERHNKAAYLVVGDSANFTNWAVGQPNEADG--TCVKADTHGSWHSASCDDNLLVVCEFYFIL    84
B. erythromelas         AFANVLERHNKEAFLVVGDSANFTNWAAGQPNKAAG--TCVKADTHGSWHSASCDDNLLVVCEFYFIL    83
B. neuwiedi             AFANVLERHGKEAYLVVGDSANFTNWAAGEPNKAAG--ACVKADTHGSWHSASCDDNLLVVCEFYFIL    83
B. jararaca             AFANVLERHGKEAYLVVGDSANFTNWAAGEPNKAAG--ACVKADTHGSWHSTSCDDNLLVVCEFYFIL    83
B. alternatus           AFANVLERHNKEAYLVVGDSANFTNWAAGEPNKAAG--ACVKADTHGSWHSTSCDDNLLVVCEFYFIL    82
B. jararacussu          AFANVLERHGKEAYLVVGDSANFTNWAAGEPNKAAG--ACVKADTHGSWHSASCDDNLLVVCEFYFML    82
C. d. terrificus        AFANVLERHNKEAFLVVGDSGNFTNWAAGQPNKADG--TCVKADKQGFWHSTSCDDNLLVVCEFYFIL    78
E. quadrivirgata        AFASVLERHNKAAYLVVQNSAKFTNWAAGEPNNADGNKLCVKADAQGAWHSASCDEDLLVVCEFSFI-    73
                        ** .*****.* *:*** :*.:***** *:*::* *   ***** :* ***:***::******* *:
```

Figura 10. Comparação da sequência de aminoácidos de αBjussuMIP (EU574627) com outras sequências de PLIs de serpentes usando base de dados SwissProt e o programa CLUSTAL. Os resíduos 49 a 143 correspondem ao domínio DRC (sublinhado superior), o resíduo Asn103 (em destaque), preservado em todas as sequências, corresponde ao sítio de glicosilação, os sítios de fosforilação (indicados em seta). α-BjussuMIP (gi:172050846) *B. moojeni* (gi:60729590); *G. blomhoffii siniticus* (gi:6467183); *T. flavoviridis* (gi:160357989); *A. nummifer* (gi:109690029); *B. erythromelas* (gi:167547093); *B. neuwiedi* (gi:167547139); *B. jararaca* (gi:167547105); *B. alternatus* (gi:167547083); *B. jararacussu* (gi:167547113); *C. d. terrificus* (gi:167547141); *E. quadrivirgata* (gi:27529820).

A

```
BjussuMIP   DPDGHVLNSLIETVMRLQREFANLKYAFLTVHKARSFGSGSERLYVTNKEVKNFEPLGEICSQAGGRIPSPQLENQNKAF 80
PHD         CCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCEEEEEECCEECHHHHHHHHHCCCCEEEECCHHHHHHH
HHpred      CCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCEEEEEECCEECHHHHHHHHHCCCEEEEECCHHHHHHH
SOPMA       CCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCEEEEEECCCEECHHHHHHHHHCCCCCCCCCCHHHHHHH
Consensus   CCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCWEEEEEWCCCEECHHHHHHHHHCCCWWWWWCHHHHHHH

BjussuMIP   ASVLERHNKAAYLVVGDSANFTNWAAGEPNEADGTCVKADTHGSWHSASCDENLLVVCEFYFIL 144
PHD         HHHHHCCCCEEEEECCCCCEECCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCCCCCCCCCEEEEEEEEEH
HHpred      HHHHHCCCCEEEEECCCCCEEECCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCCCCCCCCCEEEEEECEEEH
SOPMA       HHHHHCCCCEEEEECCCCEEECCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCCCCCCCCCEEEEEECCEEEH
Consensus   HHHHHCCCCEEEEECCCCEEEWWCCCCCCCCCCCCCEEEEEWCCCCCCCCCCWEEEEEWWEEEH
```

α-hélice	**(H)**	**42,38%**
folhas β e voltas β	**(E)**	**27,81%**
estruturas aleatórias	**(C)**	**29,80%**

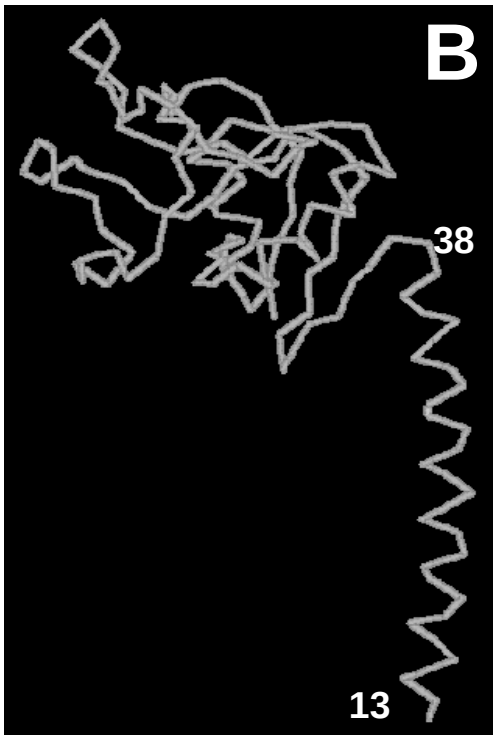

Figura 11. Predição da estrutura de αBjussuMIP. (A) A estrutura 2D do inibidor foi predita usando três programas (SOPMA, PHD e HHpred). O alinhamento consenso da proteína é mostrado, onde: C, estruturas aleatórias; E, folhas-β; H, α-hélice; W, visualizados em E ou C. **(B)** Representação esquemática de monômero de αBjussuMIP construído por modelos homólogos (*Template 3D Structure-HHpred*). Os resíduos das posições de 13-38 deste é uma região conhecida por mediar a trimerização de domínios de lectinas nestes inibidores.

Tabela 2. Perfil de massas do αBjussuMIP obtido dos peptídeos trípticos por MALDI-TOF-MS.

m/z Submetido	MH^+ Marcado	Delta Da	Início	Fim	Sequência
892.4887	893.0366	0.13	79	86	(K) AFASVLER (H)
1093.6252	1094.3040	0.13	44	52	(R) LYVTNKEVK (N)*
1271.6855	1272.4583	0.14	79	89	(K) AFASVLERHNK (A)*
1577.7377	1578.7544	0.15	53	67	(K) NFEPLGEICSQAGGR (I)
1680.9108	1681.9874	0.13	20	33	(R) EFANLKYAFLTVHK (A)*

* (Met) foi modificado por oxidação

Tabela 3. Sítios de fosforilação no αBjussuMIP em comparação com outros αPLIs.

Proteína	Posição	Resíduo
αBjussuMIP	9	S
	39	S
	47	T
	82	S
	129	S
B. moojeni	9	S
	39	S
	47	S
	129	S
T. flavoviridis	9	S
	39	S
	47	S
	82	S
	129	S
G. b. siniticus	39	S
	47	T
	129	S
A. nummifer	9	S
	47	T
	52	S
	129	S
B. erythromelas	9	S
	47	T
	129	S
B. neuwiedi	9	S
	39	S
	47	T
	129	S
B. jararaca	9	S
	39	S
	47	T
	129	S
B. alternatus	9	S
	47	T
	129	S
B. jararacussu	9	S
	39	S
	47	T
	129	S
C. d. terrificus	39	S
	47	S
	129	S
E. quadrivirgata	4	G
	52	G
	114	G
	125	G

*Sítios previstos utilizando o programa *gene runner*.

Tabela 4. Comparação das sequências codificadoras de aminoácidos para o αBjussuMIP e outros αPLIs das serpentes do gênero *Bothrops*

Aminoácido	*Codon*	Frequência (%)						
		αBjussuMIP	***B. erythromelas***	***B. alternatus***	***B. newviedi***	***B. jararacussu***	***B. jararaca***	***B. moojeni***
A (Ala)	GCG	14	13	6	13	13	6	14
	GCA	57	25	19	19	19	19	57
	GCT	14	25	25	31	31	25	14
	GCC	14	38	50	38	38	50	14
C (Cys)	TGT	50	100	100	100	100	100	50
	TGC	50	0	0	0	0	0	50
D (Asp)	GAT	71	71	71	78	67	71	56
	GAC	29	29	29	22	33	29	44
E (Glu)	GAG	31	40	36	36	36	42	30
	GAA	69	60	64	64	64	58	70
F (Phe)	TTT	63	33	38	50	50	38	63
	TTC	38	67	63	50	50	62	38
G (Gly)	GGG	10	30	20	20	22	10	10
	GGA	40	30	30	40	33	40	40
	GGT	30	20	20	20	22	20	30
	GGC	20	20	30	20	22	30	20
H (His)	CAT	40	33	33	17	17	38	50
	CAC	60	67	67	83	83	62	50
I (Ile)	ATA	50	0	0	17	20	100	60
	ATT	25	40	40	33	20	40	20
	ATC	25	60	60	50	60	60	20
K (Lys)	AAG	43	33	33	33	33	38	43
	AAA	5	67	67	67	67	62	57
L (Leu)	TTG	23	14	20	14	7	14	21
	TTA	31	14	13	14	14	14	29
	CTG	8	36	33	29	36	36	7
	CTA	15	7	7	7	7	7	14
	CTT	15	14	13	14	14	14	14
	CTC	8	14	13	21	21	14	14
M (Met)	ATG	100	100	100	100	100	100	100
N (Asn)	AAT	55	42	42	36	36	36	50
	AAC	45	58	58	64	64	64	50

*

*Continuação

P (Pro)	CCG	20	25	25	25	25	25	20
	CCA	60	0	0	0	0	0	60
	CCT	0	75	75	75	75	75	0
	CCC	20	0	0	0	0	0	20
Q (Gln)	CAG	50	29	33	33	40	20	33
	CAA	50	71	67	67	60	80	67
R (Arg)	AGG	0	14	17	20	17	17	0
	AGA	100	67	67	60	67	67	100
	GGG	0	0	0	0	0	0	0
	CGA	0	17	17	20	17	17	0
	CGT	0	0	0	0	0	0	0
	CGC	0	0	0	0	0	0	0
S (Ser)	AGT	82	13	13	20	20	22	82
	AGC	0	0	0	0	0	0	0
	TCG	0	0	0	0	0	0	0
	TCA	9	25	25	30	30	22	9
	TCT	0	13	13	10	10	11	0
	TCC	9	50	50	40	40	44	9
T (Thr)	ACG	17	0	20	0	0	20	17
	ACA	50	40	40	33	33	40	67
	ACT	0	0	0	0	0	0	0
	ACC	33	60	40	67	67	40	17
V (Val)	GTG	25	56	50	50	44	56	22
	GTA	58	0	0	0	11	0	56
	GTT	8	22	25	25	22	22	11
	GTC	8	22	25	25	22	22	11
W (Trp)	TGG	100	100	100	100	100	100	100
Y (Tyr)	TAT	50	33	25	33	33	67	50
	TAC	50	67	75	67	67	33	50
End	TGA	100	100	100	100	100	100	100

5.3.2. PLI do tipo γ

5.3.2.1. Caracterização molecular do inibidor tipo γ

O produto da reação com a enzima transcriptase reversa, depois da amplificação por PCR produziu fragmentos de cDNA de 543 pb correspondente ao γBjussuMIP que codificaram para uma proteína madura, de 181 (γBjussuMIP) resíduos de aminoácidos (Figura 12). Os primeiros 24 resíduos de aminoácidos da região N-terminal foram sequenciados e também cinco peptídeos trípticos foram identificados por espectrometria de massa, a partir da proteína madura e confirmadas pela sequência de nucleotídeos (Tabela 5).

O alinhamento múltiplo das estruturas primárias do γBjussuMIP demonstrou 89-94% de similaridade com outros inibidores de serpentes do mesmo tipo (Figura 13).

A presença de sítios de fosforilação foram encontrados (S21; S22 e T111) no γBjussuMIP e comparado com outros γPLIs de serpentes (Tabela 6). As possíveis trincas de bases codificadoras de aminoácidos (*codon usage*) do γBjussuMIP e outros γPLIs, também foram elaboradas a partir da comparação das sequências de nucleotídeos (Tabela 7).

```
1   ttcgtagccagaggaaactctcgctcatgtgacttttgtcacaacataggaaaagattgc 60
1   F  V  A  R  G  N  S  R  S  C  D  F  C  H  N  I  G  K  D  C   20
61  gaaggttaccagaaggaatgttcctctccagaagatgtatgtggcaaggtcttccttgaa 120
21  E  G  Y  Q  K  E  C  S  S  P  E  D  V  C  G  K  V  F  L  E   40
121 gtatcttcagcatcgctgtcagtcagaactattcataagaactgtttctcatccagcatc 180
41  V  S  S  A  S  L  S  V  R  T  I  H  K  N  C  F  S  S  S  I   60
181 tgcaaacttgggcaaattgatgtaaatattgggcatcactcatatataagaggaagaatc 240
61  C  K  L  G  Q  I  D  V  N  I  G  H  H  S  Y  I  R  G  R  I   80
241 aattgctgtgagaaagaaccgtgtgaagaccaaccatttccaggactgcccctgtccaaa 300
81  N  C  C  E  K  E  P  C  E  D  Q  P  F  P  G  L  P  L  S  K   100
301 ccaaatggatactattgccctggcgcattgggcttgttttccgaggacagcactgaatat 360
101 P  N  G  Y  Y  C  P  G  A  L  G  L  F  S  E  D  S  T  E  Y   120
361 gaagctatttgccatggaactgagactaagtgtattaatatcgtgggacacagacatgaa 420
121 E  A  I  C  H  G  T  E  T  K  C  I  N  I  V  G  H  R  H  E   140
421 aattttcctggggacatcgcatacaatattaaaggctgcgtttcttcctgtcctctgctg 480
141 N  F  P  G  D  I  A  Y  N  I  K  G  C  V  S  S  C  P  L  L   160
481 agtttgagcaatgcaacccatgaagaaaacagaaactatctggagaaagttgaatgtaag 540
161 S  L  S  N  A  T  H  E  E  N  R  N  Y  L  E  K  V  E  C  K   180
541 gacgccatcagattggcaagcctctga                                  567
181 D  A  I  R  L  A  S  L  -                                    188
```

Figura 12. cDNA e sequência de aminoácidos de γBjussuMIP. Sequência de cDNA (1-567 nucleotídeos) foi obtida a partir do RNA total isolado do fígado, por amplificação de produtos de PCR usando oligonucleotídeos específicos. Os aminoácidos sublinhados correspondem ao N-terminal e peptídeos internos de γBjussuMIP. A cadeia de polipeptídio madura mostra 181 resíduos de aminoácidos.

```
                    1                                50                                                  100
gamma-BjussuMIP     RSCDFCHNIGKDCEGYQKECSSPEDVCGKVFLEVSSASLSVRTIHKNCFSSSICKLGQIDVNIGHHSYIRGRINCCEKEPCEDQPFPGLPLSKPNGYYCP
B. jararaca         RSCDFCHNIGKDCDGYQQECSSPEDVCAKVFLEISSASLSVRTVHKNCFSSSICKLGQIDVNIGHHSYIRGRINCCEKEPCEDQPFPGLPLSRPNGYYCP
B. moojeni          RSCDFCHNIGKDCDGYQQECSSPEDVCGKVFLEISSASLSVRTVHKNCFSSSICKLGQIDVNIGHHSYIRGGINCCEKEPCEDQPFPGLPLSRPNGYYCP
B. neuwiedi         RSCDLCHNIGKDCDGYEQECSSPEDVCGKVFLEISSASLSVRTVHKNCFSSSICKLGQIDVNIGHQSYIRGRINCCEKEPCEDQPFPGLPLSRPNGYYCP
B. erythromelas     RSCDLCHNIGEDCDGYEQECSSPEDVCGKVFLEISSASLSVRTVHKNCFSSSICKLGQIDVNIGHQSYIRGRINCCEKEPCEDQPFPGLPLSRPNGYYCP
B. jararacussu      RSCDFCHNIGKDCDGYEQECSSPEDVCGKVFLEIPSASLSVRTVHKNCFSSSICKLGQIDVNIGHHSYIRGRINCCEKEPCEDQPFPGLPLSRPNGYYCP
B. alternatus       RSCDFCHNVGKDCDGYEQECSSPEDVCGKVFLEISSASLSVRTVHKNCFSSSICKLGQIDVNIGHHSYIRGRINCCEKEPCEDQPFPGLPLSRPNGYYCP
C. d. terrificus    RSCDFCHNIGKDCDGYEEECSSPEDVCGKVLLEISSASLSVRTVHKNCFSSSICKLGQFDVNIGHHSYIRGRINCCEKELCEDQPFPGLPLSKPNGYYCP
                    ****:***:*:**:**::*********.**:**:.********:**************:******:***** ******* ************:*******

                  101                                150                                185  Identidade (%)
gamma-BjussuMIP     GALGLFSEDSTEYEAICHGTETKCINIVGHRHENF----PGDIAYNIKGCVSSCPLLSLSNATHEENRNYLEKVECKDAIRLASL   100
B. jararaca         GALGLFTEDSTEYEAICHGTETKCIDIVGHRHEHF----PGDIAYNLKGCVSSCPLLSLSNATHEENRNYLQKVECKDAIRLASL    93
B. moojeni          GALGLFTEDSTEYEAICHGTETKCIDIVGHRHEHF----PGDIAYNLKGCVSSCPLLSLSNATHEQNRNYLEKVECKDAIRLASL    94
B. neuwiedi         GALGLFSEDSTEYEAICHGTETKCIDIVGHRHENFFSAVPEDFTYNLKGCVSSCPLLSLSNATREENRNYLEKVECKDAIRLASL    90
B. erythromelas     GALGLFTEDSTEYEAICHGTETKCIDIVGHRHENFFSAVPEDFTYNLKGCVSSCPLLSLSNATREENRNYLEKVECKDAIRLASL    89
B. jararacussu      GALGLFTEDSTEYEAICHGTETKCIDIVGHRYENF----PGDITYNLKGCVSSCPLLSLSNATREENRNYLQKVECKDAIRLASL    92
B. alternatus       GALGLFTEDSTEYEAICHGTETKCIDIVGHRYENF----PGDITYNLKGCVSSCPLLSLSNATREQNRNYLEKVECKDAIRLASL    92
C. d. terrificus    GAIGLFTKDSTEYEAICKGTETKCINIVGHRYEQF----PGDISYNLKGCVSSCPLLSLSNATFEQNRNYLEKVECKDAIRLASL    90
                    **:***::*********:*******:*****:*:*    * *::**:**************** *:******:*************
```

Figura 13. Comparação de sequência de aminoácidos de γBjussuMIP (EU574627) com outras sequências de PLIs de serpentes usando base de dados SwissProt e o programa CLUSTAL. Os resíduos de Cys (em destaque). O resíduo Asn161 (sublinhados), preservado em todas as sequências, corresponde ao sítio de glicosilação e os sítios de fosforilação (indicados em setas). γ-BjussuMIP (gi:172050848) *B. neuwiedi* (gi:157885078); *B. erythromelas* (gi:157885062); *B. alternatus* (gi:157885058); *B. jararacussu* (gi:157885072); *B. jararaca* (gi:157885068); *B. moojeni* (gi:157885074); *C. d. terrificus* (gi:45477157).

Tabela 5. Perfil de massas do γBjussuMIP obtido dos peptídeos trípticos por MALDI-TOF-MS.

m/z Submetido	MH^+ Marcado	Delta Da	Início	Fim	Sequência
1004.5199	1005.1886	0.13	170	177	(K)VECKDAIR(L)
1064.4981	1065.2665	0.14	71	78	(R)GRINCCEK(E)
1196.5985	1197.4046	0.13	165	173	(R)NYLEKVECK(D)
1609.7831	1610.9067	0.14	43	55	(R)TIHKNCFSSSICK(L)
1651.8478	1652.9222	0.15	165	177	(R)NYLEKVECKDAIR(L)

Tabela 6. Sítios de Fosforilação do γBjussuMIP comparados com de outros γPLIs

Proteína	Posição	Resíduo
γBjussuMIP	21 22 111	S S T
B. jararaca	21 22 111	S S T
B. alternatus	21 22 111	S S T
B. jararacussu	21 22 111	S S T
B. neuwiedi	21 22 111 163	S S T T
C. d. terrificus	21 22 111	S S T
B. erythromelas	21 22 111 163	S S T T

*Sítios previstos utilizando o programa *gene runner.*

Tabela 7. Comparação das sequências codificadoras de aminoácidos para o γBjussuMIP e outros γPLIs das serpentes do gênero *Bothrops*

Aminoácido	*Codon*	Frequência (%)						
		γBjussuMIP	*B. erythromelas*	*B. alternatus*	*B. newviedi*	*B. jararacussu*	*B. jararaca*	*B. moojeni*
A (Ala)	GCG	0	0	0	0	0	0	0
	GCA	40	63	57	63	57	44	50
	GCT	40	13	14	13	14	22	25
	GCC	20	25	29	25	29	33	25
C (Cys)	TGT	67	53	53	59	53	59	53
	TGC	33	47	47	41	47	41	47
D (Asp)	GAT	0	40	40	50	40	40	40
	GAC	100	60	60	50	60	60	60
E (Glu)	GAG	33	28	33	29	27	29	36
	GAA	67	72	67	71	73	71	64
F (Phe)	TTT	38	44	50	44	50	63	63
	TTC	63	56	50	56	50	38	38
G (Gly)	GGG	22	14	13	14	13	14	13
	GGA	56	50	53	50	53	64	63
	GGT	11	7	7	7	7	7	6
	GGC	11	29	27	29	27	14	19
H (His)	CAT	80	57	43	57	43	70	70
	CAC	20	43	57	43	57	30	30
I (Ile)	ATA	40	15	8	15	14	20	14
	ATT	30	46	46	46	43	40	43
	ATC	30	38	46	38	43	40	43
K (Lys)	AAG	33	44	40	40	40	40	40
	AAA	67	56	50	60	60	60	60
L (Leu)	TTG	25	22	18	17	18	18	18
	TTA	5	0	0	0	0	0	0
	CTG	30	28	35	33	35	35	35
	CTA	10	6	6	6	6	6	6
	CTT	15	28	24	28	24	24	24
	CTC	15	17	18	17	18	18	18
M (Met)	ATG	100	100	100	100	100	100	100
N (Asn)	AAT	40	64	64	64	64	60	60
	AAC	60	36	36	36	36	40	40

*

*Continuação

P (Pro)	CCG	0	33	33	22	10	33	33
	CCA	50	22	22	22	50	22	22
	CCT	38	33	33	33	30	33	33
	CCC	13	11	11	22	10	11	11
Q (Gln)	CAG	46	25	25	25	50	40	20
	CAA	54	75	75	75	50	60	80
R (Arg)	AGG	28	0	0	0	0	0	0
	AGA	33	60	60	60	60	67	63
	GGG	0	0	0	0	0	0	0
	CGA	11	20	20	20	20	22	25
	CGT	11	10	10	10	10	0	0
	CGC	17	10	10	10	10	11	13
S (Ser)	AGT	21	5	5	5	5	5	5
	AGC	14	19	20	18	21	20	20
	TCG	0	5	5	5	5	5	5
	TCA	21	29	30	32	26	30	30
	TCT	14	24	20	23	21	20	20
	TCC	29	19	20	18	21	20	20
T (Thr)	ACG	0	13	0	0	13	14	14
	ACA	29	0	13	0	0	0	0
	ACT	29	63	63	71	63	57	57
	ACC	43	25	25	29	25	29	29
V (Val)	GTG	40	20	20	20	22	25	22
	GTA	0	30	40	30	33	25	33
	GTT	20	30	20	30	22	25	22
	GTC	40	20	20	20	22	25	22
W (Trp)	TGG	100	0	0	0	0	0	0
Y (Tyr)	TAT	100	57	63	57	63	57	57
	TAC	0	43	38	43	38	43	43
End	TGA	100	100	100	100	100	100	100

5.4. Propriedades Inibitórias dos MIPs

5.4.1. Avaliação da estabilidade bioquímica dos inibidores

Os inibidores mostraram-se relativamente estáveis a uma variação de pH de 6 a 12 e temperatura de 4 a 60℃, observando-se uma redução de suas atividade inibitórias de PLA_2s em valores de pHs ácidos (2 - 4) e em temperatura elevadas de 100℃ (Figura 14). O tratamento dos BjussuMIPs com a N-glicosidase F reduziu o seu peso molecular para aproximadamente 18.000 (Figura 7A) e não interferiu na inibição das atividades fosfolipásica e anticoagulante (Resultados não mostrados).

5.4.2. Inibição da atividade fosfolipásica indireta das PLA_2s pelos inibidores

Nos ensaios de inibição da atividade fosfolipásica indireta das PLA_2s Asp49, PrTX-III e BthTX-II, pelo inibidor tipo α, foi possível observar uma redução de forma dose dependente, apresentando valores inibitórios máximos de aproximadamente 32 e 34%, respectivamente, quando utilizada a maior concentração deste inibidor. Entretanto, o αBjussuMIP não demonstrou inibição satisfatória da atividade fosfolipásica da PLA_2 CB de *C. d terrificus*. Comparando com o αBjussuMIP, o inibidor tipo γ foi mais eficiente em inibir todas as PLA_2s utilizadas no experimento, sendo possível visualizar diferenças significativas em relação ao grupo controle. Numa razão molar de 0,8:1 o inibidor tipo γ inibiu a atividade fosfolipásica em aproximadamente 40% da CB, 81% da BthTX-II, 76% da PrTX-III (Figura 15 e tabela 8).

5.4.3. Inibição da atividade anticoagulante das PLA_2s pelos inibidores

A avaliação da inibição de atividade anticoagulante das PLA_2s pelos inibidores foi realizada em testes *in vitro*. Semelhante aos resultados obtidos na neutralização da atividade fosfolipásica, o inibidor tipo α não foi eficiente em reduzir a atividade anticoagulante da PLA_2 CB, mas reduziu fracamente a atividade das PLA_2s BthTX-II e PrTX-III, mostrando uma faixa de inibição de 30-37% (Figura 16 e tabela 8).

As análises dos resultados demonstraram a ação eficaz do inibidor tipo γ diante das PLA_2s Asp49, numa razão molar de 1:1, foi apresentado uma inibição em 46% da CB, 85% da BthTX-II, e 83% da PrTX-III (Figura 16 e tabela 8).

5.4.4. Inibição da atividade edematogênica das PLA_2s pelos inibidores

Os resultados obtidos mostraram, no grupo controle, com animais tratados somente com as PLA_2s isoladas, reação característica de indução de edema após a injeção intraplantar, e tiveram sua atividade considerada em 100% no intervalo de análise após 30 minutos da injeção. O αBjussuMIP foi eficiente em inibir o edema induzido, principalmente, pelas miotoxinas BthTX-I e PrTX-I. Ao contrário, dos resultados obtidos para o inibidor tipo α, os dados de inibição do γBjussuMIP foram predominante sobre as PLA_2s BthTX-II e PrTX-III. Ambos BjussuMIPs isolados não induziram atividade edematogênica (Figura 17 e tabela 8).

5.4.5. Inibição da atividade miotóxica das PLA_2s pelos inibidores

À semelhança dos efeitos observados no teste de edema, os inibidores do tipo α e γ, em diferentes razões molares demonstraram inibição do efeito miótoxico causado por diferentes PLA_2s após injeção intramuscular no gastrocnêmio de camundongos. Nos resultados obtidos observa-se a predominância do inibidor tipo α sobre as miotoxinas Lys49, BthTX-I e PrTX-I, e ação inibitória mais envidente do inibidor tipo γ sobre as miotoxinas Asp49, BthTX-II e PrTX-III. A injeção dos mesmos inibidores sozinhos também não induziu miotoxicidade nos animais testados (Figura 18 e tabela 8).

5.4.6. Inibição da atividade citotóxica das PLA_2s pelos inibidores

A atividade citotóxica das PLA_2s foram avaliadas na presença ou ausência dos BjussuMIPs em diferentes concentrações e foi determinada sobre células endoteliais. As miotoxinas BthTX-I e PrTX-I, e BthTX-II foram inibidas de maneira dose dependente por ambos BjussuMIPs (Figura 19 e tabela 8).

5.4.7. Inibição da atividade bactericida das PLA_2s pelos inibidores

O αBjussuMIP mostrou inibição da atividade bactericida de miotoxinas BthTX-I, BthTX-II e PrTX-I contra bactérias Gram positivas (*E. coli*), principalmente sobre as miotoxinas Lys49, enquanto que, o γBjussuMIP foi mais eficiente em neutralizar, as atividades bactericidas das PLA_2s- Asp49 (Figura 20 e tabela 8).

5.4.8. Inibição da atividade de letalidade das PLA_2s pelos inibidores

Após a injeção i.p de $2xDL_{50}$ das miotoxinas Asp49 (4-6 mg/Kg) e Lys49 (6-8 mg/Kg) observou-se que todos os animais foram a óbito. Os resultados de letalidade obtidos após 24 horas de injeção das enzimas pré-incubados com os PLIs não demonstraram ocorrência de morte em nenhum dos animais tratados (resultados não apresentados). As observações destes animais também não mostraram alterações autonômicas significativas, como modificações na locomoção, frequência respiratória ou ocorrência de convulsões.

5.4.9. Inibição da atividade miotóxica da peçonha de *Bothrops jararacussu* após suplementação do soro antibrópico com BjussuMIPs

Os resultados obtidos mostraram que a peçonha de *Bothrops jararacussu* produziu a maior miotoxicidade, a qual foi considerada como 100%, para este grupo controle positivo. Ambos BjussuMIPs não induziram miotoxicidade. A utilização do soro antibotrópico sozinho neutralizou cerca de 50% da atividade miotóxica induzida pela peçonha total. Após a suplementação do soro antibotrópico com os inibidores, observou-se uma potencialização da inibição da atividade miotóxica em cerca de 72% (65μg/μL), 82% (130μg/μL) e 82% (260μg/μL) para o tipo α, e cerca de 71% (65μg/μL), 78% (130μg/μL) e 82% (260μg/μL) para o tipo γ (Figura 21). A junção dos inibidores α e γ na suplementação do soro antibotrópico mostrou inibição de 78%, 85% e 86%, quando comparado ao grupo controle, entretanto não exibiu diferença significativa em relação aos inibidores utilizados isoladamente na suplementação (Figura 21).

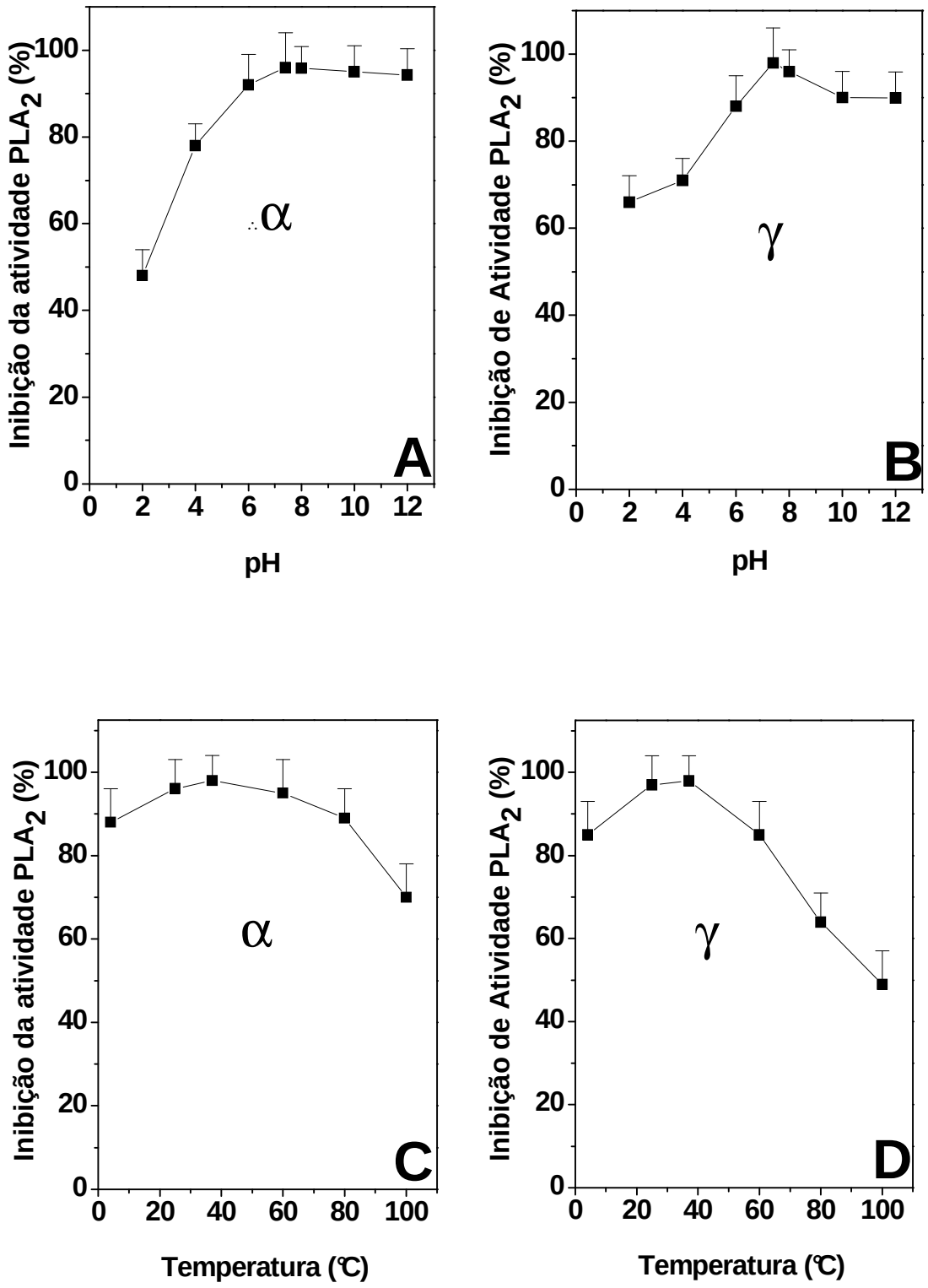

Figura 14. Estabilidade da atividade inibitória dos BjussuMIPs. αBjussuMIP **(A e C)** e γBjussuMIP **(B e D)** em diferentes condições de pH e temperatura. Esta atividade foi determinada pela prévia incubação com a Asp49-BthTX-II. Os resultados foram expressos pela média ± DP (n=6).

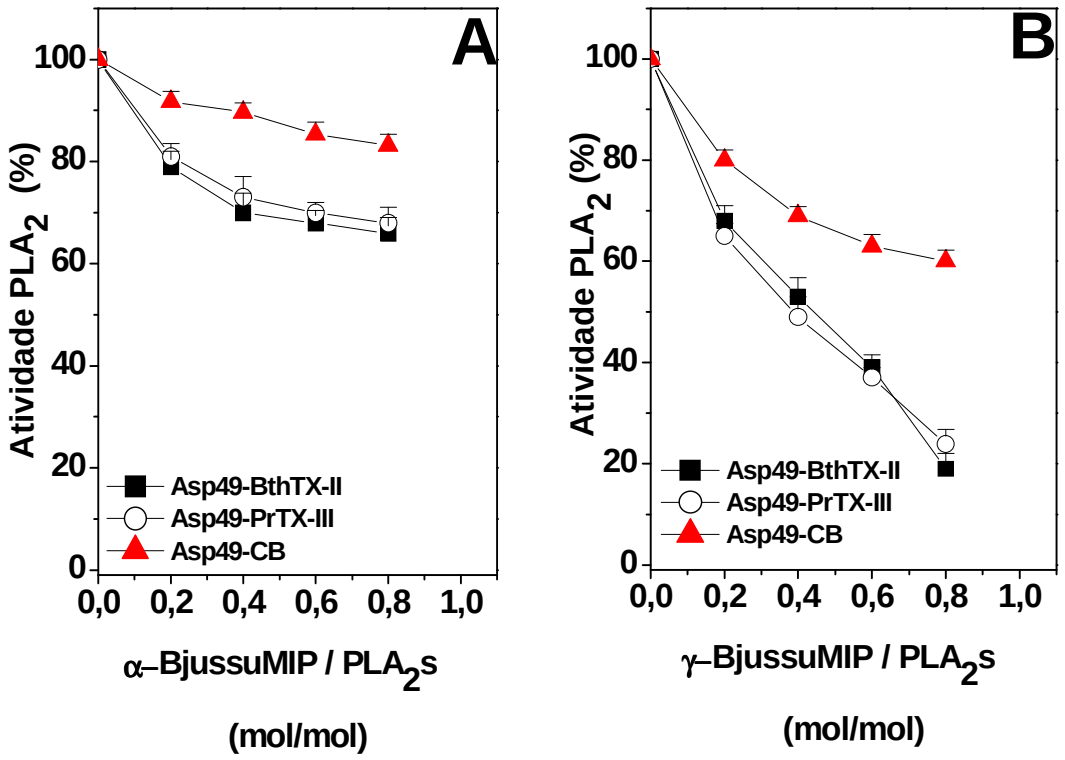

Figura 15. **Inibição da atividade fosfolipásica de PLA_2s pelos BjussuMIPs.** Neutralização das atividades PLA_2s pelo αBjussuMIP **(A)** γBjussuMIP **(B)** As PLA_2s isoladas de *B. jararacussu*, *B. pirajai* e *C. d. terrificus* foram pré-incubados com BjussuMIPs por 30 minutos e aplicadas nas placas de hemólise. A atividade fosfolipásica de cada PLA_2 sozinha (Asp49-BthTX-II, Asp49-PrTX-III e Asp49-CB) foi considerada 100%. Os resultados foram expressos pela média ± DP (n=6).

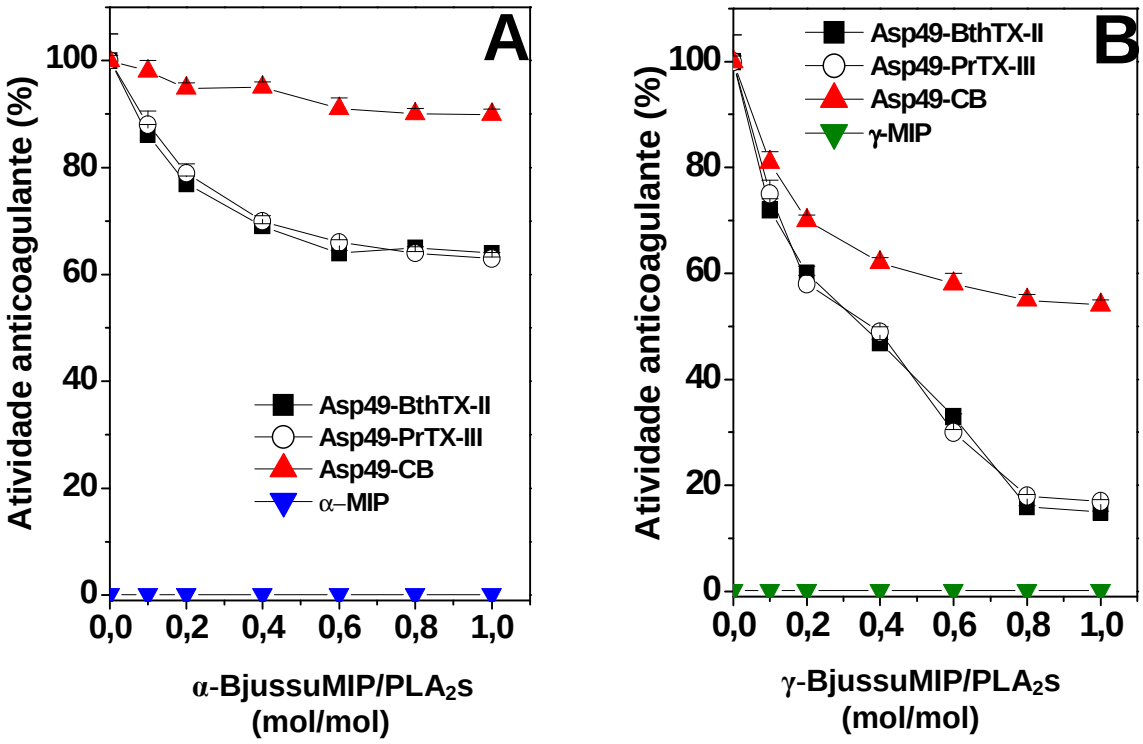

Figura 16. **Inibição da atividade anticoagulante de PLA_2s pelos BjussuMIPs.** Neutralização da atividade anticoagulante induzida pelas PLA_2s isoladas de *B. jararacussu*, *B. pirajai* e *C. d. terrificus* por αBjussuMIP **(A)** e γBjussuMIP **(B)**. A atividade anticoagulante de cada PLA_2 sozinha (Asp49-BthTX-II, Asp49-PrTX-III e Asp49-CB) foi considerada 100%. Os resultados foram expressos pela média ± DP (n=6).

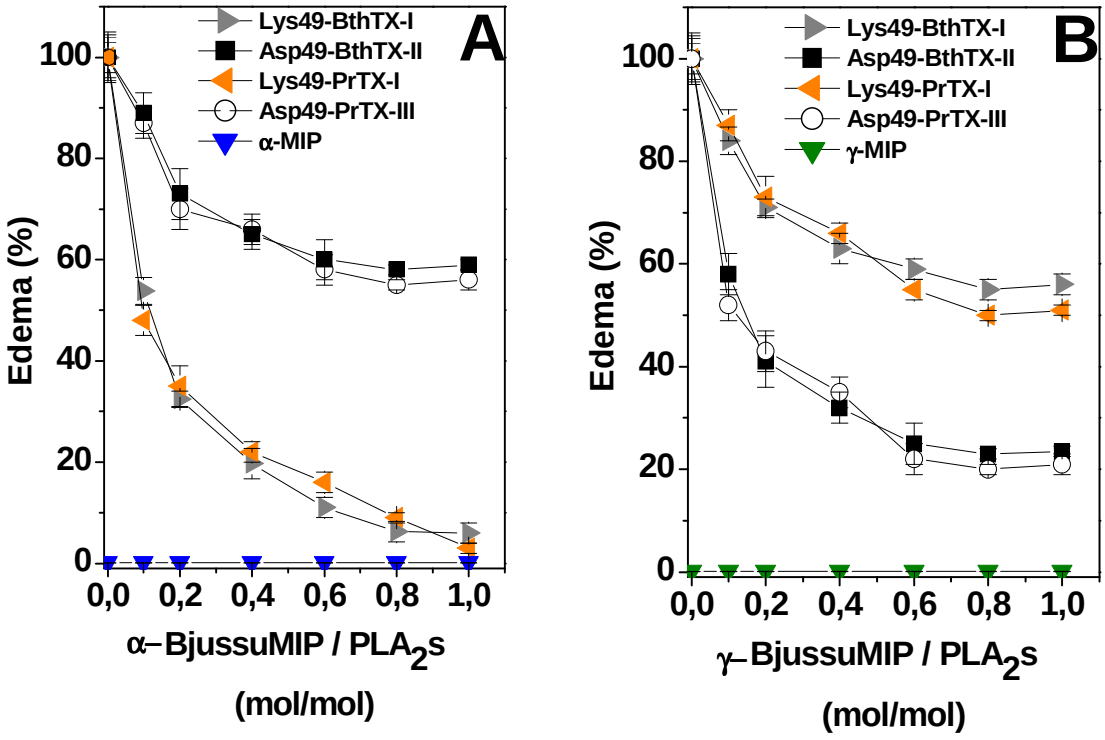

Figure 17. Inibição do edema induzido por PLA_2s pelos BjussuMIPs. Neutralização da atividade edematogênica induzida por PLA_2s Lys49 e Asp49 após incubação por 30 minutos a 37℃ com αBjussuMIP **(A)** e γBjussuMIP **(B)**. A atividade edematogênica de cada miotoxina sozinha foi considerada como 100%. Os resultados foram expressos pela média ± DP (n=6).

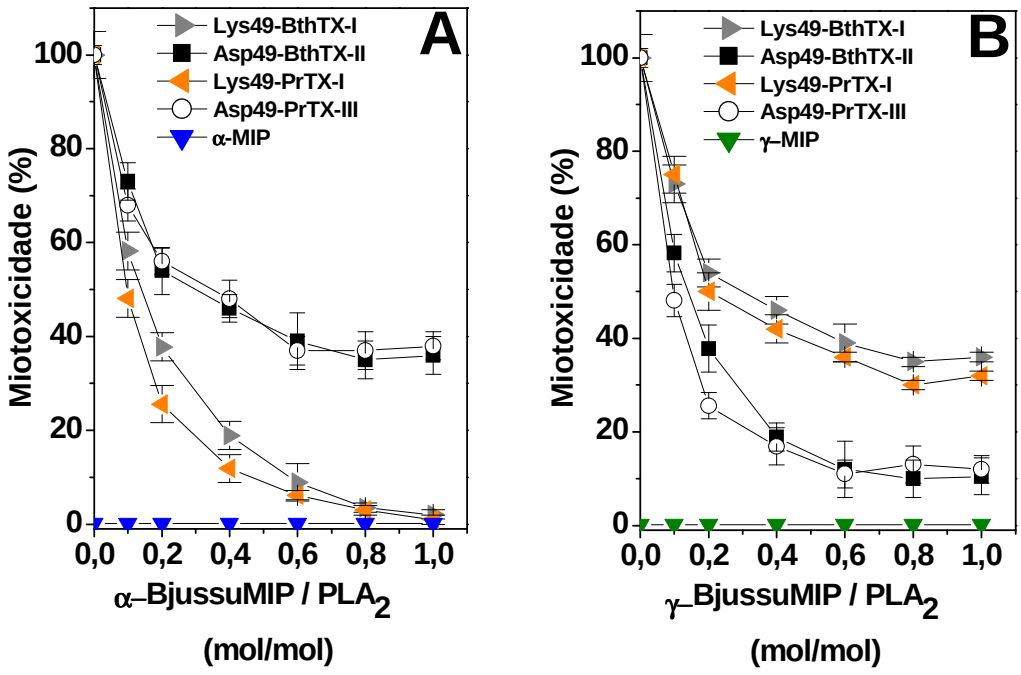

Figure 18. Inibição da miotoxicidade induzida por PLA_2s pelos BjussuMIPs. Neutralização da atividade edematogênica induzida por PLA_2s Lys49 e Asp49 após incubação por 30 minutos a 37℃ com αBjussuMIP **(A)** e γBjussuMIP **(B)**. A atividade miotóxica de cada miotoxina sozinha foi considerada como 100%. Os resultados foram expressos pela média ± DP (n=6).

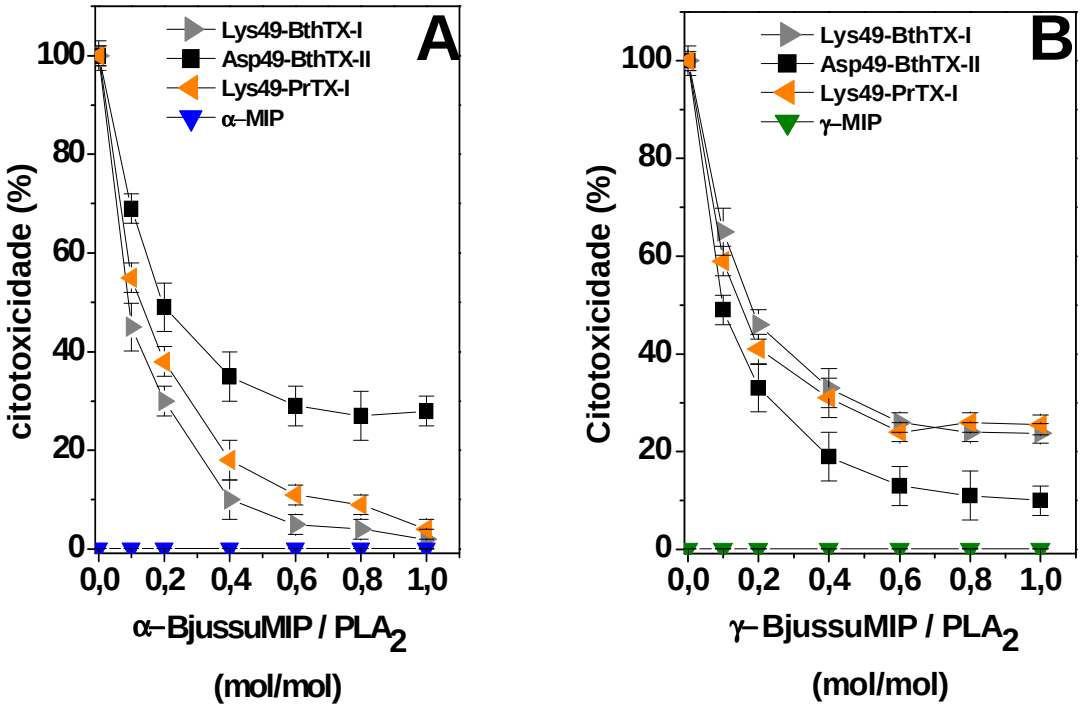

Figura 19. Inibição da citotoxicidade de PLA_2s pelos BjussuMIPs. Neutralização de atividade citotóxica sobre células endoteliais induzida por Lys49 BthTX-I e PrTX-I e Asp49 BthTX-II, após incubação com BjussuMIPs por 30 minutos. a 37℃ com αBjussuMIP **(A)** e γBjussuMIP **(B)**. A atividade citotóxica de cada miotoxina sozinha foi considerada 100%. Os resultados foram expressos pela média ± DP (n=6).

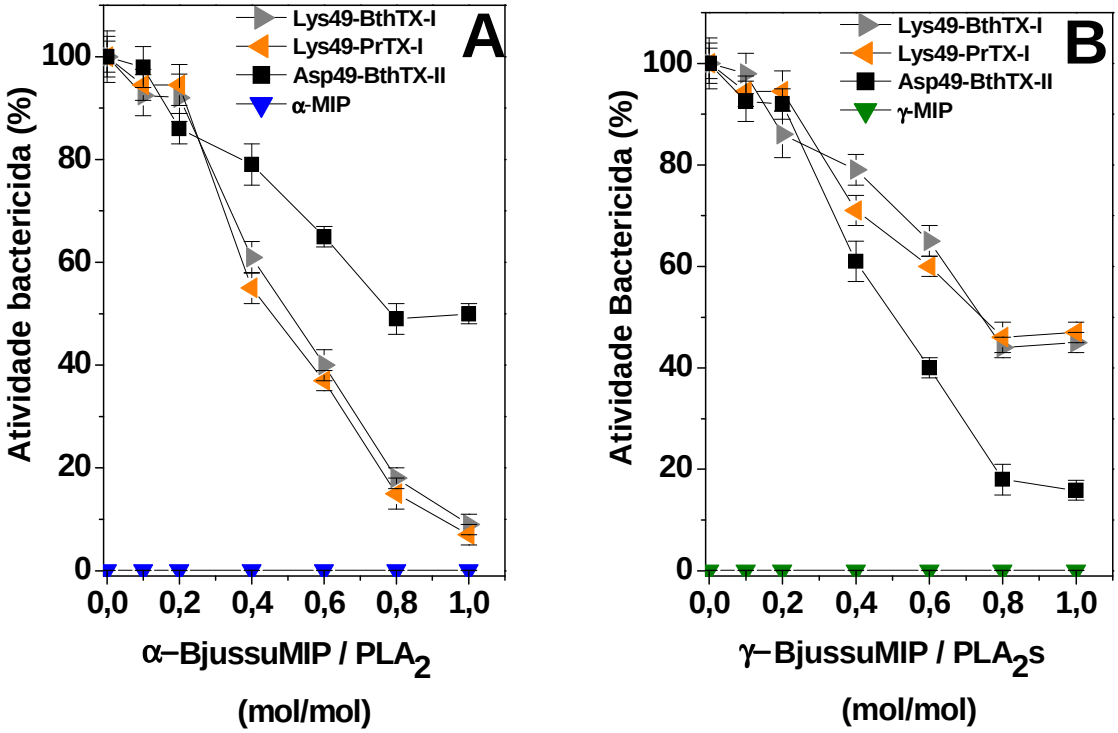

Figura 20. Inibição da atividade bactericida de PLA_2s pelos BjussuMIPs. Neutralização de atividade bactericida contra *Escherichia coli* induzida por Lys49 BthTX-I e PrTX-I e Asp49 BthTX-II, após incubação com BjussuMIPs por 30 minutos. a 37℃ com αBjussuMIP **(A)** e γBjussuMIP **(B)**. A atividade microbicida de cada miotoxina sozinha foi considerada 100%. Os resultados foram expressos pela média ± DP (n=6).

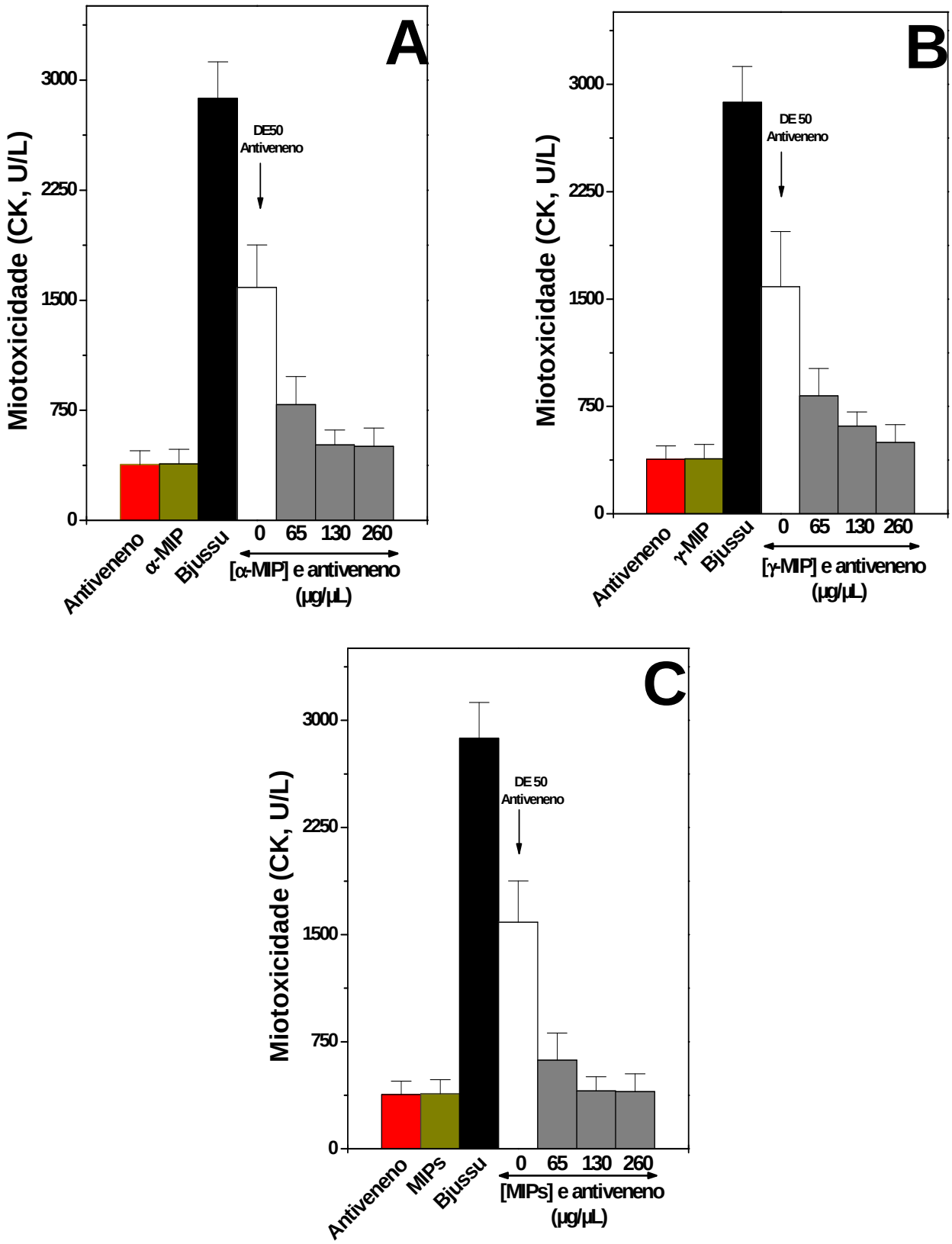

Figura 21. Propriedades do antiveneno antibotrópico suplementado com BjussuMIPs. Suplementação com αBjussuMIP **(A)** γBjussuMIP **(B)** ou os dois MIPs **(C)** em diferentes concentrações, incubados com antiveneno (DE_{50}) e a peçonha de *B. jararacussu* por 30 minutos a 37ºC e injetados via intramuscular. Os resultados foram expressos pela média ± DP (n=6).

Tabela 8. Comparação da inibição das diferentes atividades das PLA_2s pelos BjussuMIPs

Inibidor	Razão molar	Inibição (%)					Atividade
		Asp49-BthTX-II	Asp49-PrTX-III	Asp49-CB	Lys49-PrTX-I	Lys49-BthTX-I	
α	0,8	34	32	16	-	-	Fosfolipásica
γ		**81**	**76**	40	-	-	
α		35	36	10	-	-	Anticoagulante
γ		**84**	**82**	45	-	-	
α		42	45	-	**91**	**93**	Edema
γ		**77**	**80**	-	50	45	
α		65	63	-	**97**	**96**	Miotóxica
γ		**90**	**87**	-	70	65	
α		73	-	-	**91**	**96**	Citotóxica
γ		**89**	-	-	**74**	**76**	
α		51	-	-	**85**	**82**	Bactericida
γ		**82**	-	-	54	56	

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1. Isolamento das PLA_2s das peçonhas de *B. jararacussu, B. pirajai* e *C. d. terrificus* e determinação do peso molecular das PLA_2s (SDS-PAGE)

As PLA_2s são os componentes principais tóxicos das peçonhas de serpentes, consequentemente, as mais estudadas por apresentarem diversos efeitos tóxicos associados (KINI; EVANS, 1989; ARNI; WARD, 1996; SCHALOSKE; DENNIS, 2006; de MARIA et al., 2007).

Neste trabalho, foram estudadas PLA_2s e PLA_2s homólogas isoladas das peçonhas de serpentes, encontradas nas espécies de *B. jararacussu* (BthTX-I e II), *B. pirajai* (PrTX-I e III), e *Crotalus durissus terrificus* (CB). Baseando-se em metodologias já descritas, os procedimentos de purificação destas enzimas foram elaborados em temperatura ambiente, através de processos cromatográficos clássicos com apenas um passo em CM-Sepharose pH 8,0 (SOARES et al., 1998; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000), demonstrando ser um método eficaz para a obtenção destas proteínas. O alto grau de pureza destas proteínas foi confirmado por SDS-PAGE, que também permitiu a determinação da massa molecular relativa de 13.500, resultados que são condizentes com outros estudos realizados com estas proteínas (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; MANCUSO et al., 1995; TOYAMA et al., 2000; SOARES et al., 2001; 2002).

6.2. Inibidores de PLA_2s (PLIs) e BjussuMIPs

Como relatado anteriormente, algumas espécies de serpentes possuem inibidores de PLA_2s presentes em seu próprio sangue (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003; MARCUSSI et al., 2007). O número de inibidores isolados do sangue de serpentes (PLIs) tem aumentado durante os últimos anos. Estes inibidores são classificados dentro de três principais grupos denominados de α, β e γ (FORTES-DIAS, 2002 e MARCUSSI et al., 2007). Até o presente momento, o conhecimento de seus mecanismos de ação ainda é bastante limitado, sendo necessárias maiores informações em nível estrutural e funcional.

A presença destes inibidores têm sido associada à resistência das serpentes aos efeitos deletérios das PLA_2s que compõem suas peçonhas, embora possam ter papéis fisiológicos adicionais (FAURE et al., 2000; HAINS et al., 2000).

Todas as serpentes peçonhentas apresentam inibidores de PLA_2s em seus sangue, provavelmente com a finalidade de se auto-protegerem contra essas enzimas presentes na própria peçonha, que ocasionalmente, poderiam alcançar o sistema circulatório (FAURE, 2000; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003). Entretanto, este fato não explica a presença de PLIs em serpentes não peçonhentas (THWIN et al., 2000). Alguns desses inibidores apresentam homologia com proteínas de mamíferos e inibidores específicos isolados de mamíferos (PERALES et al., 1995; FAURE, 2000; FORTES-DIAS, 2002). Esta homologia entre os PLIs e os receptores de PLA_2s de mamíferos poderia explicar sua função fisiológica como anti-toxina (ANCIAN et al., 1995).

Considerando-se que vários PLIs estão presentes no sangue de diferentes espécies de serpentes (NOBUHISA et al., 1997; OHKURA et al., 1997; LIZANO;

DOMONT; PERALES, 2003) e inibem PLA_2s tóxicas específicas dentro da mesma espécie (LIZANO et al., 1997; 2000), é possível sugerir que proteínas endógenas de serpentes podem estar envolvidas na neutralização de atividades enzimáticas, farmacológicas e tóxicas.

Os inibidores do tipo α e γ podem ser encontrados em diferentes espécies e ambos podem estar presentes no mesmo plasma. O inibidor tipo γ até o presente momento foi encontrado em cinco famílias de serpentes (Elapidae, Hydrophiidae, Viperidae, Boiidae e Colubridae). Dados indicam que o inibidor γ é mais amplamente distribuído que o inibidor do tipo α, de distribuição mais restrita, sendo encontrado atualmente em apenas 2 famílias (Viperidae e Colubridae) (DUNN; BROADY, 2001; OKUMURA et al., 2003; SHIMIDA et al., 2008). Nobuhisa et al. (1997) demonstraram diferenças nos genes que codificaram os α e γPLIs em *T. flavoviridis* e sugeriram que a origem evolutiva destes dois inibidores é provavelmente diferente.

No presente trabalho, foi demonstrado o isolamento e a caracterização bioquímica, estrutural e farmacológica de duas proteínas inibitórias de PLA_2s isoladas do plasma de *Bothrops jararacussu*, denominadas de α e γBjussuMIP. Estes inibidores apresentaram massas moleculares dos monômeros, por volta de 24 e 23.5 kDa e dos oligômeros de 120 e 160 kDa para os inibidores α e γ, respectivamente. Estes resultados também são condizentes com a literatura, que apresenta outros PLIs com massas moleculares de 75 a 180 kDa para o oligômero (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003).

Outros PLIs já foram isolados por cromatografia de afinidade (LIZANO et al., 2000; SOARES et al., 2003). Baseando-se neste fato, foi utilizada esta técnica para purificar os BjussuMIPs, empregando-se o princípio de que os PLIs são capazes de interagir com as miotoxinas BthTXs, sendo o tipo α com a BthTX-I-Lys49 e o tipo γ

com a BthTX-II-Asp49. Assim, ambos BjussuMIPs foram obtidos e acumulados em quantidades ideais para os ensaios funcionais e estruturais. O alto grau de pureza destas proteínas foi confirmado por HPLC de fase reversa e SDS-PAGE.

A presença de carboidratos é comum nos PLIs (FAURE, 2000). Após deglicosilação dos BjussuMIPs, foram realizados ensaios de atividade inibitória contra PLA_2s do grupo II e os resultados demonstraram que a propriedade inibitória dos PLIs não foram afetadas *in vitro* pelo estado de deglicosilação destas proteínas. Estes dados sugerem que o domínio de carboidratos destes inibidores naturais não deve ter papel fundamental na associação *in vitro* dos PLIs com as PLA_2s (OLIVEIRA et al., 2008).

6.3. Caracterização estrutural dos PLIs

6.3.1. PLI do tipo α

Uma das propriedades comuns entre os PLIs do tipo α é a presença de domínios similares de reconhecimento de carboidrato (DRC) encontrados em lectinas tipo-C Ca^{2+}-dependentes, como por exemplo, a apoproteína surfactante do pulmão, que liga os resíduos do carboidrato que contêm manose (INOUE et al., 1991; OHKURA et al., 1993; LIZANO et al., 1997).

Nos receptores de manose de macrófagos, os DRCs têm um papel importante na endocitose de glicoproteínas e no reconhecimento de resíduos de manose na superfície de microorganismo antes da fagocitose (TAYLOR et al., 1990). Estes domínios DRCs são também elementos estruturais de receptores de PLA_2s, sendo encontrados nos receptores de PLA_2s pancreáticas humanas do grupo I e

secretórias do grupo II de coelhos, ratos, bovinos e seres humanos (LAMBEAU; LAZDUNSKI, 1999). Portanto, acredita-se que os DRCs constituem pelo menos um tipo de domínio envolvido com a ligação e inativação das PLA_2s. As regiões DRCs entre os resíduos 49 e 143, a qual inclui a Asn103 como sítio de glicosilação, são altamente conservadas (80-90%) nos αPLIs (Figura 10).

O mecanismo de ação dos αPLIs possivelmente está relacionado com a região DRC, em particular o domínio DRC5, o qual reconhece e liga-se a enzima, deste modo impedindo a atividade enzimática das PLA_2s na membrana celular (Figura 22) (NICOLAS; LAMBEAU; LAZDUNSKI, 1995; LIZANO et al., 1997; VALENTIN; LAMBEAU, 2000).

Como dito, anteriormente, a similaridade entre estes PLIs e os receptores de PLA_2s de mamíferos poderiam explicar sua função fisiológica como antitoxinas solúveis no sangue das serpentes. Foi demonstrado que alguns receptores de PLA_2s secretadas também existem em formas solúveis faltando um domínio transmembrana. Este receptor pode ter um papel importante na regulação de atividade das PLA_2s secretadas que mostram propriedades proinflamatórias em mamíferos (LAMBEAU; LAZDUNSKI, 1999; DUNN; BROADY, 2001).

Os domínios estruturais comuns em miotoxinas Lys49 e Asp49 poderiam ser reconhecidos por domínios DRC do inibidor tipo α independentemente da atividade catalítica. Portanto, a substituição de Lys49 por Asp49 não é o fator predominante para a ligação destes inibidores. Esta hipótese concorda com resultados de outros autores, que mostram que o BaMIP de *B. asper* e CgMIP-II do plasma de *Cerrophidion godmani* neutralizam subclasses destas miotoxinas (LIZANO et al., 2000; ANGULO et al., 2001). O αBjussuMIP é uma glicoproteína ácida ($M_r \cong 24.000$ para o monômero, p*I* ≅ 5,0, $M_r \cong 120.000$ para o oligômero) isolada de plasma de

Bothrops jararacussu. O seu isolamento e atividade funcional mostraram ser similares aos inibidores tipo α de PLA_2s encontrados no plasma de outras espécies de serpentes (SOARES et al., 2003; OKUMURA et al., 2005; MARCUSSI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

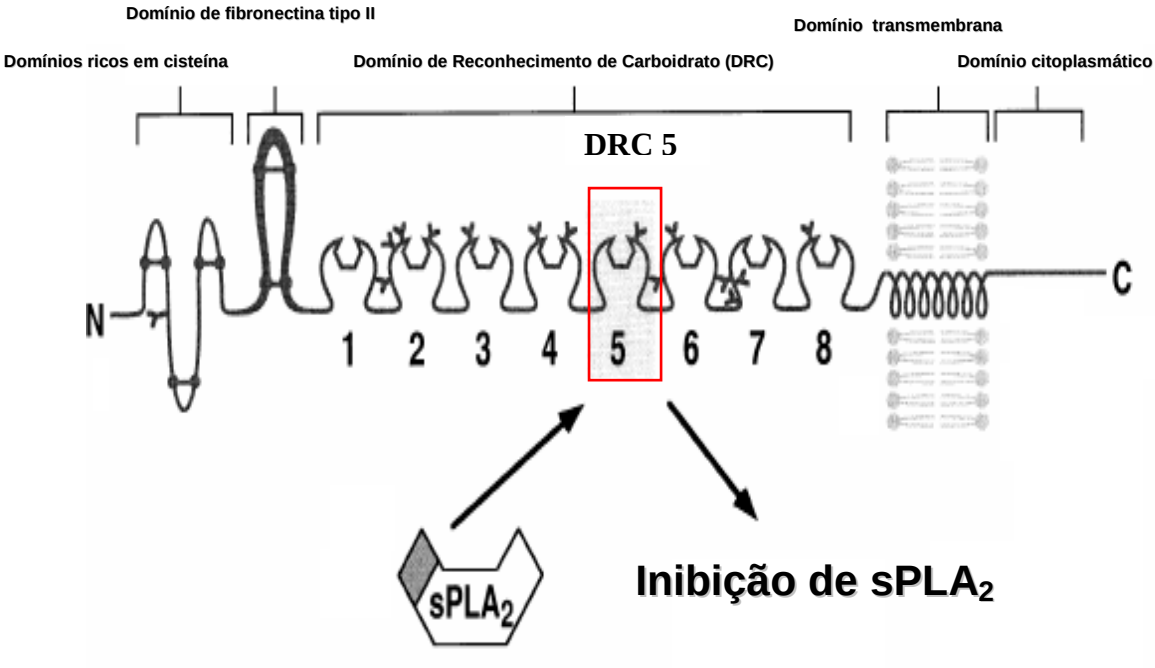

Figura 22. Representação estrutural do receptor tipo M e interação com as PLA_2s. O receptor tipo M é um tipo de proteína transmembrana. A região extracelular contém domínios ricos em cisteína, um domínio de fibronectina tipo II e repetições de oito domínios de reconhecimento de carboidrato (DRCs). Cada um desses DRCs é diferente e possuem somente 33% de similaridade entre si. Estudos de estrutura e função indicam que o DRC5 se liga as $sPLA_2$s no *loop* de Ca^{2+} e que esta ligação produz a inibição da atividade catalítica das PLA_2s, uma vez que impede a ligação do cofator Ca^{2+} (Adaptado de VALENTIN; LAMBEAU, 2000).

O mecanismo de ação do αBjussuMIP é ainda desconhecido. Entretanto, os dados do dicroísmo circular sugerem que após interação do complexo PLA_2-PLI, nenhuma mudança significativa ocorra nas estruturas secundárias das proteínas (Figura 8).

Um modelo estrutural tridimensional foi construído baseado no modelo de uma estrutura cristalina de uma proteína D surfactante pulmonar (1pwb_A, PSP-D, lectinas tipo C). Este modelo observado na figura 11 demonstrou uma estrutura similar característica dos αPLIs, tal como o αGbPLI isolado do soro de serpente *Gloydius brevicaudus* (OKUMURA et al., 2005). Estes autores sugerem que os resíduos das posições 13-36 deste αPLI são cruciais para a ligação e inibição das PLA_2s. Esta região de α-hélice é conhecida por mediar a trimerização de domínios de lectinas. Neste trabalho foi demonstrado que os resíduos de 13-38 do αBjussuMIP são localizados também em possível estrutura helicoidal (OLIVEIRA et al., 2008).

6.3.2. PLI do tipo γ

Os inibidores do tipo α são totalmente distintos dos grupos de inibidores do tipo γ, que apresentam sequências internas repetidas com um padrão de resíduos de cisteínas (OHKURA et al., 1994a; b; NOBUHISA et al., 1997).

A análise estrutural do γBjussuMIP mostrou a presença de resíduos de Ser, Thr e Tyr como potenciais sítios de fosforilação, quando comparados com outros γPLIs (Tabela 6). O γBjussuMIP apresentou o sítio de N-glicosilação no resíduo de aminoácido da posição 161. A maioria dos inibidores γ isolados de serpentes do gênero *Bothrops* mostrou o mesmo potencial sítio para glicosilação. Como é conhecido a N-glicosilação ocorre em asparaginas especificamente no trecho Asn-Xaa-Ser/Thr (onde Xaa é qualquer aminoácido exceto a Prolina) (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008; SO et al., 2008; SHIRAI et al., 2009).

Recentemente, um estudo demonstrou uma interessante comparação entre γPLIs e a possibilidade de participação de pelo menos dois sítios de fosforilação na interação com as PLA_2s, sugerindo que estas moléculas podem ter papel adicional nas serpentes, através da inativação das miotoxinas (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008). Há várias diferenças na estrutura primária das PLA_2s de peçonhas de serpentes bem como na variabilidade dos PLIs, o que poderia ser importante para garantir a eficiência destas moléculas como inibidores de PLA_2s (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008).

O γBjussuMIP apresenta um oligopeptideo (^{91}QPFPGLPLSKPNGYY^{105}), que comparado a outros γPLIs (^{104}QPFPGLPLSRPNGYY^{118}), exibem sequências similares ao decapeptídeo P-PB.III (^{107}PGLPLSLQNG^{116}), que foi sintetizado baseando-se na estrutura primária do γPLI isolado do plasma da serpente *P. reticulatus*. Alguns autores relatam que esta região é capaz de reconhecer as PLA_2s e consequentemente, poderia inibir suas atividades (THWIN et al., 2002; ESTEVÃO-COSTA et al., 2008).

Em 2008, seis novos γPLIs foram identificados em serpentes do gênero *Bothrops,* e consequentemente, uma análise estrutural comparativa foi realizada, inclusive com a espécie *Bothrops jararacussu* (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008), que teve sua estrutura comparada com a sequencia do γBjussuMIP e mostrou uma similaridade de 92% (Figura 13).

6.4. Propriedades Inibitórias dos BjussuMIPs

Através dos resultados obtidos foi possível verificar que os inibidores do tipo α e γ foram estáveis a uma variação de pH de 6 a 12, mas, instáveis quando expostos

a pHs ácidos. Esta aparente instabilidade, provavelmente deve-se aos valores de p*I* destes inibidores que são próximos aos valores de pH utilizados no experimento, podendo ocorrer então uma possível precipitação destas proteínas (BjussuMIPs) (OLIVEIRA et al., 2008).

Dentre as PLA_2s, as enzimas Asp49 são consideradas enzimaticamente ativas, tais como, a PrTX-III, a BthTX-II e crotoxina B (CB), apresentando atividade anticoagulante e hemolítica indireta, enquanto que as isoformas Lys49 podem ser consideradas inativas sobre fosfolipídios, plasma e eritrócitos (SOARES et al., 2000). Dessa forma foram utizadas somente as PLA_2s Asp49 na avaliação da inibição da atividade fosfolipásica indireta e anticoagulante (GUTIÉRREZ; OWNBY; ODELL, 1984; MOUNIER; BON; KINI, 2001). O αBjussuMIP inibiu as atividades enzimática e anticoagulante das PLA_2s-Asp49 (PrTX-III e BthTX-II), mas não mostrou inibição significativa de atividade sobre a crotoxina B. Equanto que, o γBjussuMIP exibiu maior inibição sobre todas as PLA_2s-Asp49, mas preferencialmente as botrópicas (OLIVEIRA et al., 2008). Segundo Lizano et al. (2000) é comum que inibidores do tipo α mostrem maior inibição sobre miotoxinas Lys49, ao contrário do inibidor tipo γ que exibe um perfil de inibição mais eficaz sobre PLA_2s-Asp49.

As PLA_2s isoladas neste trabalho induziram a formação de edema após injeção subplantar na pata direita dos camundongos. Um provável mecanismo de ação da reação inflamatória induzida por estas proteínas, é que estas enzimas hidrolisam fosfolipídios de membrana, liberando ácido araquidônico, e consequentemente induzindo a síntese de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, envolvidos na formação de edema (KUDO; MURAKAMI, 2002; OLIVO et al., 2007). Considerando que a atividade edematogênica das PLA_2s isoladas das

peçonhas de serpentes é muito potente com um pico máximo em 30 minutos, foi selecionado esta leitura para avaliar a inibição dos PLIs, como já realizado em trabalhos anteriores (SOARES et al., 2003). Os resultados observados neste teste mostram que o αBjussuMIP foi capaz de impedir principalmente as ações induzidas pelas miotoxinas BthTX-I e PrTX-I. Ao contrário, o inibidor tipo γ não foi tão eficiente nestas miotoxinas, mas mostrou forte inibição contra as PLA_2s-Asp49, BthTX-II e PrTX-III, sugerindo que ambos BjussuMIPs inibem fortemente a formação de edema (OLIVEIRA et al., 2008).

No teste de miotoxicidade as PLA_2s induzem uma alta liberação de creatina cinase 3 h após a injeção intramuscular em músculo gastrocnêmio de camundongos, devido a ação direta de miotoxinas sobre as células musculares (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995). O inibidor tipo α foi capaz de inibir as ações induzidas pela BthTX-I e PrTX-I, enquanto que, o tipo γ mostrou maior inibição contra a BthTX-II e PrTX-III. Estes dados sugerem que os BjussuMIPs podem inibir a ação direta das miotoxinas sobre as membranas plasmáticas de células musculares (OLIVEIRA et al., 2008), confirmando a especificidade de ação do inibidor tipo α e γ sobre miotoxinas Lys49 e Asp49, respectivamente.

Outros trabalhos também já demonstraram a capacidade de α e γPLIs de iniberem as atividades edematogênica e miotóxica induzida por diferentes PLA_2s (LIZANO et al., 2000; THWIN et al., 2000; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003), Soares et al. (2003) demonstraram que o BmjMIP, um inibidor do tipo α, isolado do plasma de serpente *Bothrops moojeni*, apresentou resultados de maior inibição sobre as PLA_2s homólogas Lys49 (BthTX-I, PrTX-I e MjTX-I e II), quando comparado à inibição exercida sobre PLA_2s-Asp49 (PrTX-III e BthTX-II). Este inibidor mostra

92% de similaridade com o αBjussuMIP (OLIVEIRA et al., 2008), descrito neste trabalho (Figura 10).

De acordo com Fortes-Dias et al. (1991; 1994), a crotoxina (CB) foi inibida por um inibidor do tipo γ isolado do plasma de serpente *Crotalus durissus terrificus*, denominado de CNF, em experimentos *in vivo*. O alinhamento múltiplo de sequências destes inibidores tipo γ demonstrou similaridade de 90% entre o CNF e o γBjussuMIP.

Estas PLA_2s além de serem capazes de induzir edema e destruir células musculares, possuem também capacidade em induzir vários efeitos tóxicos como a citotoxicidade, efeito bactericida e letalidade (MUKHERJEE et al., 2008; SAMY et al., 2008).

Nota-se que houve diferenças de efeitos dos BjussuMIPs sobre as PLA_2s no teste de citotoxicidade determinada sobre células endoteliais. O αBjussuMIP mostrou inibição significativa da Asp49-BthTX-II, mas uma maior inibição das Lys49-PrTX-I e BthTX-I. Novamente podemos observar que o γBjussuMIP foi mais ativo sobre as PLA_2s-Asp49 em relação a inibição com as PLA_2s homólogas Lys49 (OLIVEIRA et al., 2008). De forma similar, Lizano et al. (2000) isolaram dois inibidores do plasma de serpente *Cerrophidion godmani*, um denominado de CgMP-I, pertencente ao grupo γ mostrou maior inibição sobre uma miotoxina Asp49, e o outro inibidor do tipo α, o CgMP-II, foi mais eficiente em neutralizar a miotoxina Lys49 em testes de citotoxicidade.

Resultados semelhantes podem ser observados no teste de atividade bactericida, sugerindo algum tipo de especificidade que deve ser futuramente explorada para o melhor entendimento dos mecanismos de ação dos BjussuMIPs.

A administração por via intraperitoneal em camundongos dos BjussuMIPs pré-incubados com as PLA_2s, mostrou inibir a letalidade induzida por essas toxinas, não observando quaisquer alterações físicas ou comportamentais nos animais tratatados ao longo do período experimental. Esta aparente ausência de toxicidade foi confirmada pela não ocorrência de letalidade, ou outros sinais de toxicidade. Estes resultados estão condizentes com os encontrados na literatura, onde outros tipos de PLIs foram capazes de inibir a letalidade causada pelas miotoxinas (HAINS; BROADY, 2000; SOARES et al., 2003).

Neste estudo, além de sugerir a eficácia dos BjussuMIPs em neutralizar diferentes tipos de PLA_2s em diferentes atividades tais como edematôgenica, miotóxica, citotóxica, bactericida e letalidade, realizamos a pré-incubação de BjussuMIPs com um antiveneno comercial e a avaliação do efeito inibidor do soro suplementado sobre a atividade miotóxica induzida pela peçonha de *Bothrops jararacussu* em camundongos.

Muitos autores descrevem que a suplementação do soro antiofídico com inibidores naturais poderá potencializar a eficácia do tratamento de vitimados após o envenenamento com peçonhas de serpentes (SOARES et al., 2003; LIZANO et al., 1997; MARCUSSI et al., 2007). Foi possível observar que ambos BjussuMIPs e o antiveneno não apresentam miotoxicidade quando utilizados isoladamente. A peçonha de *Bothrops jararacussu* induziu a maior liberação de creatina cinase, como já era esperado, e em seguida podemos observar que o antiveneno inibiu esta miotoxicidade. Quando pré-incubado o antiveneno com os BjussuMIPs separados ou juntos, estes inibidores foram capazes de potencializar a ação neutralizante deste antiveneno.

Ainda não está totalmente claro porque razão os BjussuMIPs exibem um perfil inibitório contra o grupo II de PLA_2s secretórias. A identificação de inibidores naturais poderá fornecer uma alternativa de tratamento para o envenenamento por serpentes ou, uma provável suplementação de soro antiofídico com antitoxinas naturais, tais como anti-hemorraginas e anti-PLA_2s poderá aumentar a capacidade de neutralizar toxinas de serpente e os seus efeitos prejudiciais.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

O crescente interesse em inibidores de PLA_2s indicam a importância da participação destas enzimas em diferentes processos fisiopatológicos, como por exemplo, no envenenamento ofídico.

As compreensões das bases bioquímicas dos resultados obtidos neste trabalho permitem algumas conclusões:

1. Os BjussuMIPs foram isolados do sangue da serpente *Bothrops jararacussu*, por coluna de afinidade, utilizando as bothropstoxinas acopladas à Sepharose, tratando-se de oligômeros glicoprotéicos, ácidos de p*I* ~ 5.0 e 5.5 para o inibidor tipo α e γ respectivamente.
2. A clonagem e o sequenciamento do cDNAs dos BjussuMIPs demonstraram uma alta homologia com outros PLIs, fornecendo dados para classificar os inibidores como α e γ.
3. Os BjussuMIPs apresentaram diversas propriedades inibitórias sobre diferentes miotoxinas em diversas atividades.
4. O αBjussuMIP demonstrou maior inibição das PLA_2s homólogas Lys49 isoladas de peçonhas das espécies de serpentes *B. jararacussu* e *B. pirajai*. No entanto, é importante destacar que o inibidor do tipo α não foi eficiente em neutralizar os efeitos tóxicos induzidos pela PLA_2 Asp49 (CB) isolada de *C. d. terrificus*. Ao contrário do inibidor tipo α, o inibidor do tipo γ apresentou maior inibição das PLA_2s-Asp49 isoladas das peçonhas de *B. jararacussu* e *B. pirajai* e *C. d. terrificus.*
5. Ambos inibidores também foram eficientes na potencialização de neutralização do antiveneno comercial no teste de miotoxicidade.

As informações obtidas neste trabalho colaboram para uma melhor compreensão da caracterização bioquímica, estrutural e funcional destes inibidores plasmáticos de serpentes, assim como, enfatizam a possibilidade do uso destes inibidores naturais na suplementação da soroterapia tradicional.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

_____MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação atual do Ofidismo 2005. Portal Saúde.Disponível:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao.pdf>. Acesso em: 18 abr. 2008.

_____SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS. Disponível em: HTTP://www.fiocruz.br/sinitox/. Acesso em: 18 outubro de 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.

ANCIAN, P.; LAMBEAU, G.; MATTÉI, M.G.; LAZDUNSKI, M. The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A_2. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 8963-70, 1995.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ÂNGULO, Y.; DÍAZ, 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. 755-63, 2000.

ANGULO, Y.; NÚÑEZ, C.E.; LIZANO, S.; SOARES, A.M.; LOMONTE, B. Immunochemical properties of the N-terminal helix of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A_2 from *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 39, p. 879-87, 2001.

ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A_2--a structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827-41, 1996.

BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN, S.A.; TARVIN, T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **J. Chromatogr.**, v. 336, p. 93-104. 1984.

* *De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) – **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOCHNER, B.S.; LICHTENSTEIN, L.M. Anaphylaxis. **N. Engl. J. Méd.**, v. 324, p. 1785-90, 1991.

BON, C.; CHANGEUX, J.P.; JENG, T.W.; FRAENKEL-CONRAT, H. Post-synaptic effects of Crotoxin and its isolated subunits. **Eur. J. Biochem.**, v. 99, p. 471-81, 1979.

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipase A_2. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v. 127, p. 21-30, 2000.

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; OLIVEIRA, F.; FRANSHESCHI, A.M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, p. 1863-69, 2001.

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

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

CAVALCANTE, W.L.G.; CAMPOS, T.O.; DAL PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P.S.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A_2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, p. 490-7, 2007.

CONDREA, E.; YANG, C.C.; ROSENBERG, P. Lack of correlation between the anticoagulant activity and phospholipase hydrolis by snake venom phospholipase A_2. **Thromb. Haemost.**, v. 45, p. 82-89, 1981.

CUPPILARD, L.; MULHERKAR, R.; GOMEZ, N.; KADAM, S.; VALENTIN, E.; LAZDUNSKI, M.; LAMBEAU, G. Both group IB and group IIA secreted phospholipases A_2 are natural ligands of the mouse 180kDa M-type receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 7043-51, 1999.

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

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A_2. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 13057-60, 1994.

DENNIS, E.A. Phospholipase A_2 in Eicosanoid Generation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**, v. 161, p. 32-35, 2000.

DOMONT, G.B.; PERALES, J.; MOUSSATCHE, H. Natural anti-snake venom proteins. **Toxicon**, v. 29, p. 1183-94, 1991.

DRICHAMER, K.; DORDAL, M.S.; REYNOLDS, L. Mannose-binding proteins isolated from rat liver contain carbohydrate-recognition domains linked to collagenous tails. Complete primary structures and homology with pulmonary surfactant apoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 6878-87, 1986.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 9557-60, 1988.

DUNN, R.D.; BROADY, K.W. Snake inhibitors of phospholipase A_2 enzymes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1533, p. 29-37, 2001.

ESTEVÃO-COSTA, M.I.; ROCHA, B.C.; MUDADO, M.A.; REDONDO, R.; FRANCO, G.R.; FORTES-DIAS, C.L. Prospection structural analysis and phylogenetic relationships of endogenous gamma-phospholipase A_2 inhibitors in Brazilian *Bothrops* snakes (Viperidae, Crotalinae). **Toxicon**, v. 58, p. 122-9, 2008.

FAURE, G. Natural inhibitors of toxic phospholipase A_2. **Biochimie**, v. 82, p. 833-40, 2000.

FLEER, E.A.M.; VERHEIJ, H.M.; DE HAAS, G.H. Modification of carboxylate groups in bovine pancreatic phospholipase A_2. **Eur. J. Biochem.**, v. 113, p. 283-88, 1981.

FORTES-DIAS, C.L.; FONSECA, B.C.; KOCHVA, E.; DINIZ, C.R. Purification and properties of an antivenom factor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v. 29, p. 997-1008. 1991.

FORTES-DIAS, C.L.; LIN, Y.; EWELL, J.; DINIZ, C.R.; LIU, T.Y. A phospholipase A_2 inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Protein structure, genomic structure, and mechanism of action. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 15646-51, 1994.

FORTES-DIAS, C.L. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipase A_2 in the blood plasma of snakes. **Toxicon**, v. 40, p. 481-4, 2002.

FORTES-DIAS, C.L.; BARCELLOS, C.J.; ESTEVÃO-COSTA, M.I. Molecular cloning of a γ-phospholipase A_2 inhibitor from *Lachesis muta muta* (the bushmaster snake). **Toxicon**, v. 41, p. 909-17, 2003.

GARCÍA, M.; MONGE, M.; LEÓN, G.; LIZANO, S.; SEGURA, E.; SOLANO, G.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M. Effect of Presevatives on IgG aggregation, complement-activating effect and hypotensive activity of hourse polyvalent antivenom used in snakebite envenomation. **Biologicals**, v. 30, p. 143-151, 2002.

GARRISON, J.C. Histamine, Bradykinin, 5-Hydroxyptamine, and their antagonists. In: Gilman, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S. The pharmacological basis of therapeutics. New York, **Pergamon Press**, p. 575-99, 1990.

GRAY, W.R. End group analysis using dansylchloride. In: **Methods in Enzymology**. 25-B, 121, (HIRS, C.H. e TIMASHEFF, S.N.), 1972.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L.; ODELL, G.V. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon**, v. 22, p. 115-28, 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.; LOMONTE, B. Phospholipase A_2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-24, 1995.

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.; THEAKSTON R.D.G.; WARRELL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. **PLos Med**, v. 3, p. 727-31, 2006.

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.

HAINS, P.G.; BROADY, K. Purification and inhibitory profile of phospholipase A_2 inhibitors from Australia elapid sera. **Biochem. J.**, v. 346, p. 139-46, 2000.

HAINS, P.G.; SUNG, K.L.; TSENG, A.; BROADY, K. Functional characteristics of a phospholipases A_2 inhibitor from *Notechis ater* serum. **J. Biol. Chem.**, v. 275, 983-91, 2000.

HAINS, P.G.; NIELD, B.; SEKULOSKI, S.; DUNN, R.; BROADY, K. Sequencing and two-dimensional strucuture prediction of a phospholipase A_2 inhibitor from the serum of the common Tiger snake (*Notechis scutatus*). **J. Mol. Biol**., v. 312, p. 875-84, 2001.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, p. 615-27, 1988.

INOUE, S.; KOGAKI, H.; IKEDA, K.; SAMEJIMA, Y.; OMORI-SATOH, T. Aminoacid sequences of the two subunits of a phospholipase A_2 inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. Sequence homologies with pulmonary surfactant apoprotein and animal lectins. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 1001-7, 1991.

INOUE, S.; SHIMADA, A.; OHKURA, N.; IKEDA, K.; SAMEJIMA, Y.; OMORI-SATOH, T.; HAYASHI, K. Specificity of two types of phospholipses A_2 inhibitors from the plasma of venomous snakes. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 41, p. 529-37, 1997.

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

KINI, R.M.; EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A_2. **Toxicon**, v. 27, p. 613-35, 1989.

KINI, R.M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A_2 enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, p. 1147-61, 2005.

KOBE B, DEISENHOFER J. Review. Proteins with leucine-rich repeats. **Curr. Opin. Struct. Biol**., v. 5, p. 409-16. 1995.

KOGAKI, H.; INOUE, S.; IKEDA, K.; SAMEJIMA, Y.; OMORI-SATOH, T.; HAMAGUCHI, K. Isolation and fundamental properties of a phospholipase A_2 inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. **J. Biochem.**, v. 106, p. 966-971, 1989.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A_2 enzymes. **Prostag. Lipid. Mediat.**, v. 68-69, p. 3-58, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature,** v. 227, p. 680-85, 1970.

LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A_2, **Trends Pharmacol. Sci**., v. 20 p.162–69, 1999.

LI, Y.; YU, B.Z.; ZHU, H.; JAIN, M.K.; TSAI, M.D. Phospholipase A_2 engineering. Structural and functional roles of the highly conserved active site residue aspartate-49. **Biochem.**, v. 33, p. 14714-22, 1994.

LIZANO, S.; LOMONTE, B.; FOX, J.W.; GUTIÉRREZ, J.M. Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A_2 myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. **Biochem. J.**, v. 326, p. 853-59, 1997.

LIZANO, S.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; FOX, J.W.; LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Two phospholipase A_2 inhibitors from the plasma of *Cerrophidion* (*Bothrops*) *godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A_2 myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. **Biochem. J.**, v. 346, p. 631-39, 2000.

LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Review. Natural phospholipase A_2 myotoxin inhibitor proteins from snakes mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, p. 963-77, 2003.

LLORET, S.; MORENO, J.J. Edema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A_2 purified from porcine pancreas and snake venoms. **Toxicon**, v. 31, p. 949-56, 1993.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; BAGGE, U.; HANSON, L.A. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A_2 from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. **Biochem. Pharmacol.**, v. 47, p. 1509-18, 1994.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUFINI, S.; CHO, W.; GIGLIO, J.R.; OHNO, M.; DANIELE, J.J.; GEOGHEGAN, P.; GUTIÉRREZ, J.M. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A_2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. **Toxicon**, v. 37, p. 145-58. 1999.

MAGRO, A.J.; TAKEDA, A.A.; SOARES, A.M. FONTES, M.R. Structure of BthA-I complexed with p-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activity. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v. 61, p. 1670-7, 2005.

MANCUSO, L.C.; CORREA, M.M.; VIEIRA, C.A.; CUNHA, O.A.; LACHAT, J.J.; 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.

MARAGANORE, J.M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W. KEZDY, F.J.; HEINRIKSON, R.L. A new class of phospholipase A_2 with lysine in place of aspartate 49. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 13839-43, 1984.

MARCUSSI, S.; SANT`ANA, C.D.; OLIVEIRA, C.Z.; RUEDA, A.Q.; MENALDO, D.L.; BELEBONI, R.O.; STÁBELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.M.; SOARES, A.M. Snake venom phospholipase A_2 inhibitors: Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential. **Curr. Top. Med. Chem.**, v 28, p. 743-56, 2007.

MELO, P.A.; DO NASCIMENTO, M.C.; MORS, W.B.; SUAREZ-KURTZ, G. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon**, v. 32, p. 595-603, 1994.

MELO, P.A.; OWNBY, C.L. Ability of wedelolactone, heparin, and parabromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects two crotaline venoms and their PLA_2 myotoxins. **Toxicon,** v. 37, p. 199-215, 1999.

MORS, W.B.; NASCIMENTO, M.C.; PEREIRA, B.M.R.; PEREIRA, N.A. Plant natural products active against snakebite – the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, p. 627-42, 2000.

MOUNIER, C.M; BON, C; KINI, R.M. Review. Anticoagulant venom and mammalian secreted phospholipases A_2: protein- versus phospholipid-dependent mechanism of action. **Haemostasis**. v. 31, p. 279-87, 2001.

MUKHERJEE, A.K. Phospholipase A2-interacting weak neurotoxins from venom of monocled cobra *Naja kaouthia* display cell-specific cytotoxicity.**Toxicon.** v. 51, p. 1538-43, 2008.

NEVALAINEN, T.J.; PEURAVUORI, H.J.; QUINN, R.J.; LLEWELLYN, L.E.; BENZIE, J.A.H.; FENNER, P.J.; WINKEL, K.D. Phospholipase A_2 in cnidária. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v. 139, p. 731-5, 2004.

NICOLAS, J.P.; LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Identification of the binding domain for secretory phospholipase A_2 on their M-type 180kDa membrane receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 28869-73, 1995.

NOBUHISA, I.; INAMASU, S.; NAKAI, M.; TATSUI, A.; MIMORI, T.; OGAWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; HATTORI, S.; KIHARA, H.; OHNO, M. Characterization and evolution of a gene encoding a *Trimeresurus flavoviridis* serum protein that inhibits basic phospholipase A_2 isozymes in the snake´s venom. **Eur. J. Biochem.**, v. 249, p. 838-45, 1997.

OHKURA, N.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A_2 inhibitor from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **J. Biochem.**, v. 113, p. 413-9, 1993.

OHKURA, N.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Isolation and characterization of a phospholipase A_2 inhibitor from the blood plasma of the Thailand cobra *Naja naja Kaouthia*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 200, p. 784-88, 1994a.

OHKURA, N.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Two subunits of a phospholipase A_2 inhibitor from the blood plasma of the Thailand cobra having structural similarity to urokinase-type plasminogen activator receptor and LY-6 related proteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 204, p. 1212-18, 1994b.

OHKURA, N.; OKUHARA, H.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A_2 inhibitors from the blood plasma of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus.* **Biochem. J.**, v. 325, p. 527-31, 1997.

OHKURA, N.; KITAHARA, Y.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A_2 inhibitor from the blood plasma of the sea krait, *Laticauda semifasciata*. **J. Biochem.**, v. 125, p. 375-82, 1999.

OKUMURA, K.; OHKURA, N.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. A novel phospholipase A_2 inhibitor with leucine-rich repeats from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 19469-19475, 1998.

OKUMURA, K.; MASUI, K.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Purification, characterization and cDNA cloning of a phospholipase A_2 inhibitor from the serum of the non-venomous snake *Elaphe quadrivirgata*. **Biochem. J.**, v. 341, p. 165-71, 1999.

OKUMURA, K.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Identification of β-type phospholipase A_2 inhibitor in a nonvenomous snake, *Elaphe quadrivirgata*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 408, p. 124-30, 2002.

OKUMURA, K.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Identification and characterization of a serum protein homologous to α-type phospholipase A_2 (PLIα) from a nonvenomous snake, *Elaphe quadrivirgata*. **Life**, v. 55, p. 539-45, 2003.

OKUMURA, K.; NISHIDA, A.O.M.; HAYASHI, K.; IKEDA, K.; INOUE, S. Mapping the region of the α-type phospholipase A_2 inhibitor responsible for its inhibitory activity. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 37651-59, 2005.

OLIVEIRA, C.Z.; MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; SANT`ANA, C.D.; JANUÁRIO, A.H.; LOURENÇO, M.V.; SAMPAIO, S.V.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M. Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **J. Ethnopharmacol**., v. 98, p. 213-16, 2005.

OLIVEIRA, C.Z.; MENALDO, D.L.; MARCUSSI, S.; SANTOS-FILHO, N.A.; SILVEIRA, L.B.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M. An α-type phospholipase A_2 inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: Structural and functional characterization. **Biochimie**, v. 90, p. 1506-14, 2008.

OLIVEIRA, C.Z.; MENALDO, D.L.; STÁBELI, R.G. ; SOARES, A.M. An γ-type phospholipase A_2 inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: Structural and functional characterization. **submitted**, 2009.

OLIVO, R..A.; TEIXEIRA, C.F.P; WALLACE, J.L.; GUTIÉRREZ, J.M.; ZAMUNER, S.R. Role of cyclooxygenases in edema forming activity of *Bothrops* venoms. **Toxicon**, v. 49, p. 670-77, 2007.

OVADIA, M.; KOCHVA, E. Neutralization of Viperidae and Elapidae snake venoms by sera of different animals. **Toxicon**, v. 15, p. 541-47, 1977.

OWNBY, C.L.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A_2 proteins. **Toxicon**, v. 37, p. 411-45, 1999.

PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOECHEA, J.A.; GORVEL, J.P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A_2 from *Bothrops asper* snake venom synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. **Eur. J. Biochem.**, v. 253, p. 452-61. 1998.

PERALES, J.; VILLELA, C.; DOMONT, G.B.; CHOUMET, V.; SALIOU, B.; MOUSSATCHÉ, H.; BON, C.; FAURE, G. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. **Eur. J. Biochem.**, v. 227, p. 19-26, 1995.

PERALES, J.; DOMONT, G.B. Are inhibitors of metalloproteinases, phospholipases A_2 and myotoxins members of the innate immune system ? In : MÉNEZ, A. (Ed). **Persp. Mol. Toxin.**, p. 435-56, 2002.

PÉREZ, J.C.; SÁNCHEZ, E.E. Natural protease inhibitors to hemorrhagins in snake venoms and their potential use in medicine. **Toxicon**, v. 37, p. 703-28, 1999.

QUIRÓS, S.; ALAPE-GIRÓN, A.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Isolation characterization and molecular cloning of AnMIP, a new α-type phospholipase A_2 myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Atropoides nummifer* (Viperidae: Crotalinae). **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v. 146, p. 60-68, 2007.

RAW, I.; ROCHA, M.C.; ESTEVES, M.I.; KAMIGUTI, A.S. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 19, p. 333-38, 1986.

ROCHA, S.L.G.; LOMONTE, B.; NEVES-FERREIRA, A.G.C.; TRUGILHO, M.R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M; HO, P.L.; DOMONT, G.B.; GUTIÉRREZ, J.M.; PERALES, J. Functional analysis of DM64, an antimyotoxic protein with immunoglobulin-like structure from *Didelphis marsupialis* serum. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, p. 6052-62, 2002.

ROSSI, M.A.; PERES, L.C.; DE PAOLA, F.; CUPO, P.; HERING, S.E.; AZEVEDO-MARQUES, M.M. Electron-microscopic study of systemic myonecrosis due to poisoning by tropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) in humans. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 113, p. 374-77, 1989.

SAMY, R.P.; THWIN, M.M.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; IGNACIMUTHU, S. Ethnobotanical survey of folk plants for the treatment of snakebite in Southern part of Tamilnadu, Índia. **J. Ethnopharmacol.**, v. 115, p. 302-12, 2008.

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A_2 superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, p. 1246-59, 2006.

SCOTT, D.L.; WHITE, S.P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M.H.; SIGLER, P.B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A_2. **Science**, v. 250, p. 1541-6, 1990.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; DE SOUZA, D.H.F. Métodos em toxinologia., **Editora Edufscar**, São Carlos, p. 7-258, 2007.

SHIMADA, K.; OHKURA, N.; HAYASHI, K.; SAMEJIMA, Y.; OMORI-SATOH, T.; INOUE, S.; IKEDA, K. Subunit structure and inhibition specificity of α-type phospholipase A_2 inhibitor from *Protobothrops flavoviridis*. **Toxicon**, v. 51, p. 787-96, 2008.

SHIMIDT, J.M. Antivenom therapy for snakebites in children: is there evidence?. **Curr. Opin. Pediatr.**, v. 17, p. 234-8, 2005.

SHIRAI, R.; TORIBA, M.; HAYASHI, K.; IKEDA, K.; INOUE, S. Identification and characterization of phospholipase A_2 inhibitors from the serum of the japanese rat snake, *Elaphe climacophora*. **Toxicon**, v. 53, p. 685-92, 2009.

SO, S.; CHIJIWA, T.; IKEDA, N.; NOBUHISA, I.; ODA-UEDA, N.; HATTORI, S.; OHNO, M. Identification of the B subtype of gamma-phospholipase A_2 inhibitor from

Protobothrops flavoviridis serum and molecular evolution of snake serum phospholipase A_2 inhibitors. **J. Mol. Evol.**, v. 66, p. 298-307, 2008.

SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; BORGES, M.H.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; CUNHA, O.A.; HOMSI-BRANDERBUGO, M.I.; GIGLIO, J.R. Inhibition of proteases, myotoxins and phospholipases A_2 from *Bothrops* venoms by the heteromeric protein complex of *Didelphis albiventris* opossum serum. **Biochem. Mol. Biol. Int.** v. 43, p. 1091-9, 1997.

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 Lys-49 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.M.; 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. 201-209, 2000b.

SOARES, A.M.; MANCIN, A.C.; CECCHINI, A.L.; ARANTES, E.C.; FRANÇA, S.C.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A_2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **Int. J. Biochem. Cell. Biol**., v. 33, 877-88, 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.; MARCUSSI, S.; STÁBELI, R.G.; FRANÇA, S.C.; GIGLIO, J.R.; WARD, R.J.; ARANTES, E.C. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A_2 myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 302, p. 193-200, 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.

SOARES, A.M.; TICLI, F.K.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M.V.; JANUÁRIO, A.H.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P.S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, p. 2625-41, 2005.

SRIBAR, J.; KOVACIC, L.; DRASKOVIC, P.; FAURE, G.; KRIZAJ, I. The first phospholipase inhibitor from the serum of *Vipera ammodytes ammodytes*. **FEBS J.**, v. 274, p. 6055-64, 2007.

STÁBELI, R.G; AMUI, S.F.; SANT'ANA, C.D.; PIRES, M.G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M.C.; ROMÃO, P.R.T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.M.; SOARES, A.M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A_2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comp. Biochem. Physiol**. **C Toxicol. Pharmacol**., v. 142, p. 371-81, 2006.

TAYLOR, M.E.; CONARY J.T.; LENNERTZ, M.R.; STAHL, P.D.; DRICKAMER, K. Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains*.* **J. Biol. Chem.**, v. 265, p.12156-62, 1990.

THEAKSTON, R.D.G.; WARREL, D.A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon**, v. 41, p. 541-57, 2003.

THWIN, M.M.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: a mini review of the recent developments (1991-1997). **Toxicon**, v. 36, p. 1471-82, 1998.

THWIN, M.M.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; KINI, R.M.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Recombinant antitoxic and anti-inflammatory factor from the nonvenomous snake *Python reticulates*: Phospholipase A_2 inhibition and venom neutralizing potential. **Biochem.,** v. 39, p. 9604-11, 2000.

THWIN, M.M.; SATISH, R.L; CHAN, S.T.F.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Functional site of endogenous phospholipse A_2 inhibitor from *Python* serum. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, p. 719-27, 2002.

TICLI, F.K.; HAGE, L.I.S.; CAMBRAIA, R.S.; PEREIRA, P.S; MAGRO, A.J.; FONTES, M.R.M.; STÁBELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A_2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v. 36, p. 318-27, 2005.

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 A_2 homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Biochimie**, v. 82, p. 245-50, 2000.

TRENTO, E.P.; GARCIA, O.S.; RUCAVADO, A.; FRANÇA, S.C.; BATALINI, C.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M. Inhibitory properties of the anti-bothropic complex from *Didelphis albiventris* serum on toxic and pharmacological actions of metalloproteases and myotoxins from *Bothrops asper* venom. **Biochem. Pharmacol**., v. 62, p. 1521-1529, 2001.

TSUBOI, K.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A. Prostanoid receptor subtypes, **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 68-69, p. 535-556, 2002.

TU, A.T. Overview of snake venom chemistry. **Adv. Exp. Med. Biol**., v. 391, p. 37–62, 1996.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A_2 and their receptors and binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, p. 59-70. 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 A_2, role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochem.**, v.19, p. 743-48, 1980.

VERHEIJ, H.M; SLOTBOOM, A.J.; DE HAAS, G.H. Structure and function of phosphoslipase A_2. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol**., v. 91, p. 91-203, 1981.

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

VITAL-BRAZIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. **Rev. Assoc. Med.**, v. 26, p. 212-8, 1980.

VITAL-BRAZIL, O. Peçonhas. **In: Farmacodinâmica.** (Corbett, C.E.). Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. p. 679-697, 1982.

WANG, Y.M.; WANG, J.H.; PAN, F.M.; TSAI, I.H. Lys-49 phospholipase A_2 homologs from venoms of *Deinagkistrodon acutus* and *Trimeresurus mucrosquamatus* have identical protein sequence. **Toxicon,** v. 34, p. 485-489, 1996.

WARD, R.J.; DE AZEVEDO, W.F. jr.; ARNI, R.K. At the interface: crystal structures of phospholipases A_2. **Toxicon**, v. 36, p. 1623-33, 1998.

WHITE, R.T.; DAMM, D.; MILLER, J.; SPRATT, K.; SCHILLING, J.; HAWGOOD, S.; BENSON, B.; CORDELL, B. Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene. **Nature**, v. 317, p. 361-363, 1985.

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 phospholipase A_2. **Biochem.**, v. 32, p. 6485-92, 1993.

YUAN, Y.; JACKSON, S.P.; MITCHELL, C.A.; SALEM, H.H. Purification and characterisation of a snake venom phospholipase A_2: a potent inhibitor of platelet aggregation. **Thromb. Res.**, v.70, p. 471-8, 1993.