Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**“Caracterização Funcional e Estrutural de uma
Fosfolipase A₂ Ácida Tóxica Isolada da Peçonha de *Bothrops
moojeni*”**

NORIVAL ALVES SANTOS-FILHO

Ribeirão Preto – SP

2009

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**“Caracterização Funcional e Estrutural de uma Fosfolipase A₂
Ácida Tóxica Isolada da Peçonha de *Bothrops moojeni*”**

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Norival Alves Santos-Filho

Orientador: Andreimar Martins Soares

Ribeirão Preto – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Norival Alves Santos-Filho

Caracterização Funcional e Estrutural de uma Fosfolipase A₂ Ácida Tóxica Isolada do Peçonha de *Bothrops moojeni*. Ribeirão Preto, 2009

84p. :fig

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Soares, Andreimar Martins

1. Miotoxinas

2. *Bothrops moojeni*

3. Fosfolipase A₂

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno _____

Título do trabalho _____

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

Orientador: _____

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho:

A minha família...

Agradecimentos

Agradeço inicialmente a minha família, pelo apoio e compreensão. Saibam que apesar da distância, estou sempre pensando em vocês.

Agradeço a minha namorada Claudia, por compartilhar os momentos especiais da minha vida. Te amo. Agradeço também à família da Claudia, pela companhia e pelos bons momentos que passamos juntos.

Ao meu orientador, Andreimar Martins Soares, por ter me concedido o privilégio desta orientação e por todo o comprometimento com a qualidade deste trabalho. Você é um exemplo de dedicação e amor à ciência.

Ao Clayton, Danilo, Lucas, Silvana, Sabrina, Renata, Carolina, Johara e Tássia, pelo companheirismo e apoio. Pessoas fantásticas com as quais aprendi muito e passei bons momentos.

Ao Prof. Dr. José Roberto Giglio, pelo inestimado auxílio teórico.

À Lara e ao Beto, pela ajuda sempre necessária.

À Prof. Dra. Suely Vilela (FCFRP-USP), por ter cedido espaço no laboratório, colaborando para a realização da parte bioquímica deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório de Toxicologia da FCFRP, Adélia e João Franco, pela amizade e auxílio técnico-científico fundamental para a realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Toxicologia da FCFRP, Marco Aurélio, Leandro, Raquel, Gilmara e Lanuze, pela amizade e bons momentos.

À Profa. Dra. Eliane C. Arantes Braga (FCFRP-USP), ao Prof. Dr Fabio de Oliveira (UFU), ao Prof. Dr. Marcelo Beletti (UFU), ao Prof. Dr. Auro Nomizo (FCFRP-USP), ao Prof. Dr. André Fuly (UFF) e à Carla Mamede (UFU), pelo auxílio na realização deste trabalho.

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

RESUMO

SANTOS-FILHO, N.A. Caracterização Funcional e Estrutural de uma Fosfolipase A₂ Ácida Tóxica Isolada da Peçonha de *Bothrops moojeni* . 2009. 84fl. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

As fosfolipases A₂ (PLA₂s, E.C. 3.1.1.4) pertencem a uma superfamília de enzimas que realizam a clivagem de fosfolipídios da membrana celular em ácidos graxos e lisofosfolipídios, numa reação dependente de cálcio. As PLA₂s apresentam um importante papel em várias funções celulares, incluindo manutenção dos fosfolipídios celulares, geração de prostaglandinas e leucotrienos, tradução de sinais, proliferação celular e contração muscular. O presente trabalho teve como objetivo a caracterização estrutural e funcional de uma fosfolipase A₂ ácida tóxica (BmooTX-I) isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*. A BmooTX-I foi purificada por uma combinação de cromatografias em resinas de troca iônica (DEAE-Sephacel), exclusão molecular (Sephadex G-75) e interação hidrofóbica (Phenyl-Sepharose CL-4B). A confirmação do grau de pureza foi realizada através de análise por espectrometria de massa MALDI TOF da BmooTX-I reduzida (monômero, 13.802,66 Da) e não reduzida (dímero, 27.506,38 Da), da focalização isoeletrica (pI 4,2) e de SDS-PAGE. A região N-terminal da enzima apresentou alta homologia com outras PLA₂s Asp49 de peçonhas de serpentes. A BmooTX-I apresentou também elevada atividade fosfolipásica e induziu edema moderado *in vivo*. Além disso, foi capaz de inibir a agregação plaquetária e a coagulação do plasma, induzir a liberação de PGI₂ por HUVECs e apresentar efeito citotóxico sobre células tumorais, bactérias e fungos. O tratamento da

enzima com o reagente brometo de *p*-bromofenacila (BPB) neutralizou a atividade enzimática e de inibição da agregação plaquetária. A determinação da miotoxicidade foi realizada através da dosagem dos níveis de CK no plasma de camundongos previamente injetados com a toxina. A análise histopatológica das fibras musculares demonstrou a presença de infiltrado inflamatório e líquido intercelular, ambos confirmados pela análise ultra-estrutural. O presente trabalho deverá contribuir para a elucidação e determinação da composição bioquímica dos venenos animais, já que as fosfolipases A₂ ácidas tóxicas possuem mecanismos de ação ainda não totalmente esclarecidos.

Palavras chave: Fosfolipase A₂ ácida, *Bothrops moojeni*, BmooTX-I, Atividade anti-tumoral, Efeito bactericida.

ABSTRACT

SANTOS-FILHO, N.A. **Functional and Structural Characterization of an Acidic Toxic Phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* Snake Venom.** 2009. 84fl. Dissertation (Scientific Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Phospholipases A₂ (PLA₂s, EC 3.1.1.4) belong to a superfamily of enzymes that perform the cleavage of phospholipids of cell membranes in fatty acids and lysophospholipids in a calcium dependent reaction. PLA₂s have an important role in several cellular functions, including maintenance of cellular phospholipids, the generation of prostaglandins and leukotrienes, translation signals, cell proliferation and muscle contraction. This study aimed at the structural and functional characterization of an acidic and toxic phospholipase A₂ (BmooTX-I) isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. BmooTX-I was purified by a combination of chromatographic steps on resins of ion exchange (DEAE Sephacel), molecular exclusion (Sephadex G-75) and hydrophobic interaction (Phenyl Sepharose CL-4B). The confirmation of the purity degree was analyzed by MALDI TOF mass spectrometry of reduced BmooTX-I (monomer, 13,802.66 Da) and not reduced (dimer, 27,506.38 Da), by isoelectric focusing (pI 4.2) and by SDS-PAGE. The N-terminal region of the enzyme showed high homology with other Asp49 PLA₂s of snake venoms. BmooTX-I also presented high phospholipase activity and induced moderate edema *in vivo*. Furthermore, this enzyme was capable of inhibiting platelet aggregation and plasma coagulation, inducing the release of PGI₂ by HUVECs, also showing cytotoxic effects on tumor cells, bacteria and fungi. Treatment of the enzyme with the p-bromophenacyl bromide (BPB) neutralized the enzymatic activity and the inhibition of platelet aggregation. The determination of myotoxicity was accomplished through the determination of the CK levels in plasma of mice previously injected with the toxin. The histopathological analysis of muscle fibers showed the presence of inflammatory infiltration and intercellular fluid, both confirmed by ultrastructural analysis. This work

contributes to the elucidation and determination of the biochemical composition of animal venoms, since the mechanisms of action of toxic acidic phospholipases A_2 are not yet fully understood.

Keywords: Acidic phospholipases A_2 ; *Bothrops moojeni*, BmooTX-I, Antitumoral activity, Bactericidal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização das Principais Espécies de Serpentes do Gênero <i>Bothrops</i>	3
Figura 2: Local de hidrólise de diferentes fosfolipases.....	5
Figura 3: Hidrólise do fosfolipídio.....	6
Figura 4: Via de catálise dos fosfolipídios.....	9
Figura 5: Purificação da PLA ₂ ácida da peçonha de <i>B. moojeni</i>	35
Figura 6: Confirmação do grau de pureza de BmooTX-I.....	36
Figura 7: Comparação dos resíduos de aminoácidos da seqüência N-terminal de BmooTX-I com outras Asp49 PLA ₂ de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	38
Figura 8: Atividade hemolítica indireta de BmooTX-I.....	40
Figura 9: Influência do pH, íons metálicos e BPB na hidrólise de substratos NBD.....	42
Figura 10: Efeito de BmooTX-I na inibição da agregação plaquetária.....	44
Figura 11: Efeito de BmooTX-I na liberação de PGI ₂	45
Figura 12: Atividade Miotóxica e análise histopatológica de BmooTX-I.....	47
Figura 13: Análise Ultra-estrutural de secções transversais do músculo gastrocnêmio de camundongos após tratamento com BmooTX-I ou PBS.....	48
Figura 14: Atividade citotóxica de BmooTX-I.....	50
Figura 15: Porcentagem de edema induzido.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das PLA ₂ s.....	11
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidônico

ADP: Adenosina 5'-difosfato

AMBIC: Bicarbonato de amônio

Bis-acrilamida: N',N' – metilenobisacrilamida

Bmoo-TX-I: Fosfolipase A₂ ácida isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*

BPB – Brometo de *p*-bromofenacila

BSA: Soro albumina bovina

CK: Creatina cinase

DMSO: Dimetil-sulfóxido

EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético

MjTX-II: Fosfolipase A₂ básica isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*

Mr: Massa molecular relativa

PA: Ácido fosfatídico

PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS: Tampão fosfato em salina

PC: Fosfatidilcolina,

PE: Fosfatidiletanolamina

PG: Fosfatidilglicerol

PLA₂ : Fosfolipase A₂

PPP: Plasma pobre em plaquetas

PRP: Plasma rico em plaquetas

RPMI: Meio de cultura do “**Roswell Park Memorial Institute**”, Gibco-BRL

SBF: Soro bovino fetal

SD: "*Standard Deviation*" - Desvio padrão

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TEMED: N',N',N',N' – tetrametiletilenodiamina

TFA: Ácido trifluoracético

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivos.....	17
3. Material e métodos	18
3.1. Material.....	18
3.2. Animais.....	18
3.3. Obtenção da peçonha.....	19
3.4. Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i>	19
3.5. Cromatografia de exclusão molecular da fração E3 em gel Sephadex G-75	20
3.6. Cromatografia de interação hidrofóbica em resina Phenyl-Sepharose.....	20
3.7. Determinação quantitativa de proteínas	20
3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes e determinação do peso molecular aparente	21
3.9. Focalização Isoelétrica	22
3.10. Sequenciamento N-terminal	23
3.11. Espectometria de massa.....	23
3.12. Atividade hemolítica indireta (fosfolipásica em gel)	24
3.13. Determinação da dose hemolítica indireta mínima (DheM).....	25
3.14. Atividade fosfolipásica sobre lipídios fluorescentes	25
3.15. Atividade anticoagulante	27
3.16. Efeito sobre plaquetas	27
3.17. Liberação de Prostaglandina I ₂ (PGI ₂)	28
3.18. Atividade miotóxica	28
3.19. Análise Histopatológica das fibras musculares	30
3.20. Análise ultra-estrutural da lesão tecidual induzida por BmooTX-I	30
3.21. Atividade Citotóxica.....	31
3.22. Indução de edema.....	32

3.23. Modificação química	33
3.24. Análise estatística.....	33
4. Resultados	34
4.1. Isolamento e Caracterização Bioquímica da PLA ₂ ácida tóxica da peçonha de <i>Bothrops moojeni</i>	34
4.2. Caracterização Enzimática e Farmacológica	39
5. Discussão e Conclusão.....	52
6. Referências	66

1. INTRODUÇÃO

Acidentes causados por serpentes peçonhentas representam um significativo problema de Saúde Pública, especialmente em países tropicais, pela frequência com que ocorrem e pela mortalidade que ocasionam (PINHO; PEREIRA, 2001).

Existem no mundo aproximadamente 2.700 espécies de serpentes, das quais um quinto são serpentes peçonhentas (MEBS, 2002). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2005, foram notificados 126.617 acidentes, envolvendo 113 óbitos somente no ano de 2005, o que representa uma média de 25.523 casos/ano para o país. Das notificações, referentes ao ano de 2005, 87,5% estão relacionados a serpentes do gênero *Bothrops*. O acidente ofídico acomete, com maior frequência, adultos jovens do sexo masculino durante o trabalho na zona rural (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Dentre as famílias de serpentes existentes no Brasil, existem quatro gêneros de serpentes peçonhentas: *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu, caíçaca), *Crotalus* (cascavel), *Lachesis* (surucucu) e *Micrurus* (coral-verdadeira). Os acidentes ocorrem em todo o país, porém a distribuição por gênero de serpente peçonhenta indica predomínio do acidente botrópico (84,0%), seguido do crotálico (9,8%), laquélico (2,6%), elapídico (0,6%) e por serpentes não-peçonhentas (2,9%). A sazonalidade é uma característica marcante, relacionada a fatores climáticos e da atividade humana no campo, que determina ainda um predomínio de incidência nos meses quentes e

chuvosos, em indivíduos do sexo masculino e na faixa etária de 15 a 49 anos. A letalidade geral é baixa (0,4%), sendo maior no acidente crotálico (1,9%) em relação aos demais (laquético: 0,9%, botrópico e elapídico: 0,3%). Por outro lado, a frequência de sequelas, relacionada a complicações locais, é bem mais elevada, estando em torno de 10% nos acidentes botrópicos, associada a fatores de risco como o uso de torniquete, picada em extremidades (dedos de mãos e pés) e retardo na soroterapia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005)

O gênero *Bothrops* é o mais importante do ponto de vista médico já que, como citado anteriormente, é responsável por mais de 80% dos 20.000 acidentes ofídicos anuais ocorridos no Brasil. As serpentes deste gênero habitam preferencialmente ambientes úmidos como matas, áreas cultivadas e locais de proliferação de roedores, em zonas rurais. Possuem hábitos noturnos e são consideradas serpentes muito agressivas (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

As serpentes deste gênero compreendem cerca de 30 espécies, distribuídas por todo território nacional (Figura 1). As espécies mais conhecidas são: *B. atrox*, encontrada no norte do Brasil; *B. neuwiedi*, encontrada em todo o território nacional, exceto região norte do país; *B. jararaca*, distribuída na região sul e sudeste; *B. jararacussu*, encontrada no cerrado da região central e em florestas tropicais do sudeste, *B. alternatus*, distribuída ao sul do país e *B. moojeni*, encontrada nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia (BARRAVIEIRA, 1991; JORGE; RIBEIRO, 1992).

Figura 1: Localização das principais espécies de serpentes do gênero *Bothrops*
(TOKARNIA; PEIXOTO, 2006)

De acordo com o Ministério da Saúde (2005), acidente botrópico, aquele causado por serpentes do gênero *Bothrops*, determina processo inflamatório no local da picada, com edema intenso, equimose, dor e adenomegalia regional

que progridem ao longo do membro acometido; bolhas com conteúdo seroso ou sero-hemorrágico e, eventualmente, necrose cutânea. Sistemicamente há alteração da coagulação sanguínea e sangramentos espontâneos (gengivorragia, equimoses, hematomas pós-trauma e hematúria). Pacientes acometidos por envenenamentos por serpentes deste gênero podem apresentar como complicações: abscesso, síndrome compartimental, necrose com amputação e/ou seqüela funcional, sangramento maciço, choque e insuficiência renal aguda.

Na maioria dos casos, o diagnóstico é clínico, baseado nas manifestações apresentadas pelo paciente, ou etiológico, quando há identificação do animal, o que é pouco frequente. Na ausência de alterações clínicas, o paciente deve ser mantido em observação por 6 a 12 horas após o acidente, e caso o quadro permaneça inalterado, deve ser considerada a possibilidade de acidente por serpente não-peçonhenta ou acidente por serpente peçonhenta sem envenenamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

As peçonhas de serpentes são, provavelmente, as mais complexas de todas as peçonhas animais conhecidas, contendo 20 ou mais componentes diferentes, sendo que mais de 90% do peso seco corresponde a proteínas, com uma grande variedade de enzimas, e uma parte não protéica composta por carboidratos, lipídios, metais, aminoácidos livres, nucleotídeos, entre outros (VARANDA; GIANINNI, 1999; ROBERTO et al., 2004a; CALVETE et al., 2007).

Os componentes das peçonhas de serpentes incluem citotoxinas, cardiotoxinas, fatores de crescimento de nervos, lectinas, inibidores enzimáticos e várias enzimas como, fosfolipases (dentre elas as fosfolipases

A₂), metaloproteases, serinoproteases, fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, L-aminoácido oxidases, catalases, ATPases, hialuronidasas, NAD nucleosidase e β- glucosaminidasas (TU, 1996; JIANG et al., 2009).

As fosfolipases são uma superfamília de enzimas que atuam sobre membranas celulares realizando a clivagem de fosfolipídios em ácidos graxos e lisofosfolipídios. Existem diferentes tipos de fosfolipases, dependendo do sítio de hidrólise (Figura 2). As fosfolipases A₂ (PLA₂s) (E.C. 3.1.1.4) foram as primeiras fosfolipases a serem conhecidas e sua descoberta foi baseada na observação da ação do suco pancreático de mamíferos e da peçonha de serpentes na hidrólise de fosfatidilcolina (WITTCOFF, 1951).

Figura 2: Local de hidrólise de diferentes fosfolipases (adaptado de KINI, 1997).

A PLA₂s são enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídios, catalisando especificamente a hidrólise de fosfolipídios na ligação éster do carbono 2 e liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos (Figura 3), em uma reação dependente de cálcio (ARNI; WARD, 1996; KUDO; MURAKAMI, 2002). Estas enzimas apresentam um importante papel em várias funções celulares incluindo manutenção dos fosfolipídios celulares, geração de prostaglandinas (PGs) e leucotrienos, tradução de sinais, proliferação celular e contração muscular. Além disso, sabe-se que estas enzimas estão envolvidas em processos inflamatórios humanos (DENNIS et al., 1991; SANTOS-FILHO, et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 3: Hidrólise de um fosfolipídio por PLA₂. Quebra da ligação *Sn*-2 do fosfolipídio e consequente liberação do lisofosfolipídio e ácido graxo (adaptado de KINI, 1997).

As fosfolipases A_2 são enzimas amplamente distribuídas na natureza e apresentam elevado interesse médico-científico dado ao seu envolvimento em várias doenças inflamatórias humanas e em envenenamentos por serpentes e abelhas. São encontradas em uma variedade de fluídos biológicos e células, como bactérias, plantas, tecidos de mamíferos (pulmão, fígado, baço, coração), eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleares. No entanto, as mais conhecidas e amplamente estudadas são aquelas encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos e nas peçonhas de répteis e insetos (DENNIS, 1994; SOARES; GIGLIO, 2003; SOARES et al., 2004a; DE GRAAF et al., 2009).

Tem sido estabelecido que a atividade catalítica das PLA_2 s apresenta um papel chave em certos efeitos farmacológicos (CHANG; SU, 1982; DÍAZ-OREIRO; GUTIÉRREZ, 1997), entretanto, estudos demonstram que alguns efeitos farmacológicos são independentes das atividades catalíticas destas enzimas (KINI; EVANS, 1997; PÁRAMO et al., 1998; SOARES et al., 2001). A ausência de uma estreita correlação entre as atividades enzimáticas e farmacológicas, junto com a diversidade de efeitos biológicos destas proteínas aumentam os interesses sobre quais seriam as bases estruturais para suas funções biológicas.

Uma crescente rede de evidências sugere que estas atividades podem ser mediadas por interações entre PLA_2 s provenientes de peçonhas de serpentes (sv PLA_2 s) e aceptores endógenos de PLA_2 s na membrana da célula alvo (LAMBEAU; LAZDUNSKI, 1999; HANASAKI; ARITA, 1999; VALENTIN; LAMBEAU, 2000). A identificação de PLA_2 s endógenas de mamíferos (SIX; DENNIS, 2000), e a descoberta do seus aceptores em células humanas

(SRIBAR et al., 2001; HIGASHINO et al., 2002; BOILARD et al., 2003) aumentaram o número de alvos potenciais e possíveis mecanismos de ação para as svPLA₂s.

A associação entre a atividade PLA₂ e o processo patológico causado por essas enzimas tem sido objeto de vários estudos nas últimas décadas (MURAKAMI et al., 1997; RODRIGUES et al., 2004; RODRIGUES et al., 2007; COSTA et al., 2008; SANTOS-FILHO et al., 2008). No organismo, na presença de cálcio, a hidrólise dos fosfolipídios resulta na formação de ácidos graxos livres, os quais são precursores de eicosanóides (Figura 4) (KUDO; MURAKAMI, 2002).

A taxa de hidrólise das PLA₂s é consideravelmente aumentada quando os fosfolipídios estão em suas formas agregadas, como micelas ou bicamada, e o mecanismo enzimático pelo qual esse processo de ativação ocorre ainda é um paradigma para a catálise interfacial (BERG et al., 2001).

Os lisofosfolipídios resultantes da hidrólise atuam como mensageiros secundários e podem ser posteriormente catalisados por fatores ativadores de plaquetas. O ácido araquidônico, por sua vez, é substrato para duas vias enzimáticas: a via das ciclooxygenases (Cox) (Figura 4), a qual produz prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina (RIBARDO et al., 2001); e a via catalisada pela Lipoxigenase (Lox), que gera como substratos leucotrienos e lipoxinas (PETERS-GOLDEN, 1998) (Figura 4). Esses produtos metabólicos atuam como mediadores pró-inflamatórios (CORDA et al., 2002).

Figura 4: Via de catálise dos fosfolipídios.

As peçonhas animais são ricas fontes de fosfolipases A_2 e essas enzimas possuem uma grande variedade de efeitos farmacológicos e/ou tóxicos, como mionecrótico, anticoagulante, inibição de agregação plaquetária, neurotóxico, cardiotoxico, hipotensor e indutor de edema (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997; HARRIS et al., 2000; SINGH et al., 2000; SOARES et al., 2004a; SANTOS-FILHO et al., 2008).

Devido ao seu papel central em muitos processos celulares, as PLA_2 s de uma variedade de fontes têm sido exaustivamente estudadas, não somente com o intuito de entender suas bases moleculares do mecanismo catalítico e suas ligações interfaciais (SCOTT; SIGLER, 1994), mas também para elucidar

suas funções regulatórias no organismo e no interior das células (MURAKAMI et al., 1997; MURAKAMI; KUDO, 2001).

As PLA₂s constituem uma superfamília de enzimas pertencentes a 15 grupos e seus subgrupos (Tabela 1), que também podem ser divididas em cinco tipos distintos: as denominadas PLA₂s secretadas (sPLA₂), dentre elas as PLA₂s encontradas em peçonhas de serpentes, as PLA₂s citossólicas (cPLA₂), as PLA₂s Ca²⁺ independentes (iPLA₂), as acetil-hidrolases fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH) e as PLA₂s lisossomais (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). O sistema de classificação agrupa as PLA₂s considerando a origem, sequência de aminoácidos, mecanismos catalíticos, características bioquímicas adicionais, funcionais e estruturais.

Segundo Schaloske e Dennis (2006), as sPLA₂s, são enzimas com Mr variando entre 14.000 e 18.000, usualmente contendo de 5 a 8 pontes dissulfeto. Estas enzimas apresentam uma histidina no sítio ativo e requerem a presença do íon Ca²⁺ para a catálise. As fosfolipases A₂ dos grupos IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII, XIV são representantes das sPLA₂s (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação das PLA₂s.

Grupo	PLA ₂	Fonte	Massa relativa (Mr)	Características
IA	sPLA ₂	Hydrophiidae e Elapidae	13–15	7 pontes dissulfeto
IB	sPLA ₂	Pâncreas suíno e humano	13–15	7 pontes dissulfeto
IIA	sPLA ₂	Crotalinae, fluido sinovial humano	13–15	7 pontes dissulfeto
IIB	sPLA ₂	Víbora de Gaboon	13–15	6 pontes dissulfeto
IIC	sPLA ₂	Testículo de rato e murino	15	8 pontes dissulfeto
IID	sPLA ₂	Baço/pâncreas humano e murino	14–15	7 pontes dissulfeto
IIE	sPLA ₂	Cérebro/coração/útero humano e murino	14–15	7 pontes dissulfeto
IIF	sPLA ₂	Testículo/embrião humano e murino	16–17	6 pontes dissulfeto
III	sPLA ₂	Humano/murino/lagarto/abelha	15–18; 55 (humano/murino)	8 pontes dissulfeto
IVA	cPLA ₂	Humano/murino	85	Domínio C2
IVB	cPLA ₂	Humano	114	Domínio C2
IVC	cPLA ₂	Humano	61	Acilado
IVD	cPLA ₂	Humano/murino	92–93	Domínio C2
IVE	cPLA ₂	Murino	100	Domínio C2
IVF	cPLA ₂	Murino	96	Domínio C2
V	sPLA ₂	Macrófago/pulmão/coração de humano e murino	14	6 pontes dissulfeto
VIA-1	iPLA ₂	Humano/murino	84–85	8 repetições de sequência consenso
VIA-2	iPLA ₂	Humano/murino	88–90	7 repetições de sequência consenso
VIB	iPLA ₂	Humano/murino	88–91	Ligada a membrana
VIC	iPLA ₂	Humano/murino	146	Proteína integral de membrana
VID	iPLA ₂	Humano	53	Triacilglicerol lipase
VIE	iPLA ₂	Humano	57	Triacilglicerol lipase
VIF	iPLA ₂	Humano	28	Triacilglicerol lipase
VIIA	PAF-AH	Humano,murino,suíno,bovino	45	Secretada,α/β hydrolase
VIIIB	PAF-AH	Humano,bovino	40	Intracelular,PAF α/β hydrolase
VIIIA	PAF-AH	Humano	26	Intracelular, tríade Ser/His/Asp, homodímero ou heterodímero
VIIIB	PAF-AH	Humano	26	Intracelular, tríade Ser/His/Asp, homodímero ou heterodímero
IX	sPLA ₂	Caracol (conodipine-M)	14	6 pontes dissulfeto
X	sPLA ₂	Leucócito/timo/baço humanos	14	8 pontes dissulfeto
XIA	sPLA ₂	Broto verde de arroz (PLA2-I)	12.4	6 pontes dissulfeto
XIB	sPLA ₂	Broto verde de arroz (PLA2-II)	12.9	6 pontes dissulfeto
XII	sPLA ₂	Humano/murino	19	7 pontes dissulfeto
XIII	sPLA ₂	Parvovírus	<10	sem pontes dissulfeto
XIV	sPLA ₂	Fungo simbiótico/bactéria	13–19	2 pontes dissulfeto
XV	PLA ₂ lisossomal	Humano,murino,bovino	45 (deglicosilada)	Tríade Ser/His/Asp, glicosilada,sequência sinal N-terminal

*De acordo com Schaloske e Dennis (2006).

As PLA₂s de peçonhas de serpentes (svPLA₂s) estão classificadas no grupo I e II, sendo que as da família Viperidae encontram-se no grupo IIA (SIX; DENNIS, 2000; SOARES et al., 2004a; RODRIGUES et al., 2004).

As svPLA₂s pertencentes ao grupo IIA foram divididas em subgrupos, dos quais destacam-se: (i) PLA₂s Asp49, enzimas que usualmente apresentam alta atividade catalítica, e (ii) PLA₂s símiles Lys49, com baixa ou nenhuma atividade enzimática sobre substratos artificiais (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997; OWNBY et al., 1999, SOARES et al., 2004a).

As primeiras PLA₂s do grupo IIA foram inicialmente isoladas de plaquetas e fluidos sinoviais (GRONROOS; NEVALAINEN, 1992). Nevalainen (1993) mostra que durante o processo inflamatório a concentração de PLA₂s do grupo IIA é aumentada. Além disso, elevadas concentrações de PLA₂s deste grupo foram observadas em várias condições patológicas, como choque séptico, pancreatite aguda e câncer (GRONROOS et al., 2002). Estes resultados sugerem que PLA₂s do grupo IIA desempenham um papel fundamental no processo inflamatório, porém podem não ser somente o único tipo de PLA₂ secretada envolvida neste processo (DENNIS, 1997). Uma sPLA₂ do grupo V foi também isolada de tecido inflamado (HAN et al., 1998).

As PLA₂s do grupo V envolvidas em processos inflamatórios são geralmente encontradas em tecidos como coração, pulmão e placenta. Além disso, tem sido demonstrado que PLA₂s do grupo V estão envolvidas na catálise e liberação do ácido araquidônico e produção de prostaglandinas em células inflamatórias, como macrófagos e mastócitos (HAN et al., 1999; BALSINDE et al., 2000).

Estudos têm sido realizados com o intuito de entender a correlação entre a atividades das sPLA₂ e sua expressão durante a inflamação (MURAKAMI et al., 1997). Inicialmente, foi encontrado que o aumento de quantidades de prostaglandinas, leucotrienos e lisofosfolípidios, também chamados de citocinas inflamatórias, pode levar ao desenvolvimento e progressão de doenças inflamatórias e, em muitos casos, ao desenvolvimento de câncer (DENNIS, 2000; CORDA et al., 2002).

No caso de peçonhas botrópicas, como no de outras espécies de serpentes, existem isoformas de fosfolipases A₂ que aparecem em um mesmo indivíduo ou em diferentes indivíduos da mesma espécie (TOYAMA et al., 2000; COGO et al., 2006). Sabe-se que as serpentes possuem vários genes que codificam diversas isoformas, no entanto a expressão e síntese destas não são bem conhecidas ainda. Embora essas isoformas apresentem grande semelhança bioquímica, significativas diferenças são detectadas em suas atividades enzimáticas e farmacológicas.

Várias metodologias têm sido empregadas para compreender a relação estrutura-função de diversas enzimas homólogas às PLA₂s de peçonhas de serpentes, na tentativa de elucidar o mecanismo de ação destas enzimas multifuncionais, como modificações químicas de resíduos de aminoácidos (SOARES; GIGLIO, 2003; STÁBELI et al., 2006), mutagênese sítio dirigida (CHIOATO; WARD, 2003; SÁ et al., 2004; CHIOATO et al., 2007), técnicas espectrofotométricas, cristalográficas (MARCHI-SALVADOR et al., 2008; CORRÊA et al., 2008) e ressonância magnética nuclear (TORRES et al., 2003; AMININASAB et al., 2004), além de estudos de ligação com inibidores e substratos naturais e artificiais (OWNBY et al., 1999; LIZANO et al., 2003;

MARCHI-SALVADOR et al., 2006; DOS SANTOS et al., 2007).

As fosfolipases A₂ ácidas de peçonhas de serpentes, particularmente aquelas do gênero *Bothrops*, ainda não foram completamente caracterizadas, aumentando o interesse em seus estudos nos últimos anos. Várias pesquisas têm sido realizadas em relação à caracterização bioquímica, farmacológica e estrutural dessas PLA₂s, para um melhor entendimento de seus mecanismos de ação. Daniele e colaboradores (1995; 1997) purificaram três isoformas ácidas provenientes da peçonha de *Bothrops neuwiedii*, denominadas P1, P2 e P3, sendo que nenhuma possui atividade miotóxica. Serrano et al. (1999) isolaram uma PLA₂ ácida não-tóxica (Bj-PLA₂) da peçonha de *Bothrops jararaca* que induz inibição da agregação plaquetária e apresenta um alto grau de homologia sequencial com outras PLA₂s ácidas de peçonhas. Outra PLA₂ ácida não-tóxica foi isolada da peçonha de *B. jararacussu*, denominada BthA-I-PLA₂ e caracterizada em nível funcional e estrutural (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; ROBERTO et al., 2004a; b; MAGRO et al., 2003; 2005).

Cogo et al. (2006) apresentaram um trabalho, no qual eles purificaram, sequenciaram e analisaram estruturalmente duas fosfolipases A₂ ácidas miotóxicas da peçonha da serpente *Bothrops insularis*, com pIs de 5,05 e 4,49 e pesos moleculares de 13.900 e 13.700, respectivamente. Modesto et al. (2006) purificaram, clonaram e caracterizaram uma PLA₂ ácida, com pI de 4,67 e peso molecular de 13.600 da peçonha de *B. erythromelas*, com uma potente ação de inibição plaquetária e indução de liberação de prostaglandinas I₂ por células endoteliais.

As PLA₂s ácidas, em geral, não apresentam atividade miotóxica, porém, quando apresentam, essa atividade é baixa tanto *in vivo* quanto *in vitro* em relação a outras PLA₂s básicas, altamente miotóxicas. Em contrapartida, as PLA₂ ácidas apresentam maior atividade catalítica (ROSENBERG, 1986). Nisenbom et al. (1986) observaram primeiramente o efeito tóxico de PLA₂s ácidas de peçonhas de serpentes, mostrando que uma PLA₂ ácida de *Bothrops alternatus* causa danos severos em tecidos como fígado, pulmões e coração. Ketelhut et al. (2003) mostraram também o efeito tóxico de quatro PLA₂s ácidas de *B. jararacussu*, com atividade miotóxica. Rodrigues et al. (2007) purificaram uma PLA₂ ácida e miotóxica da serpente *Bothrops pauloensis* com alta homologia estrutural com outras fosfolipases A₂. Estudos complementares com estas enzimas de caráter ácido devem ser realizados para possibilitar a correlação de seus mecanismos enzimáticos e tóxicos com suas possíveis aplicações farmacológicas.

O estudo das peçonhas ofídicas é de grande importância sob vários aspectos. Deve-se ressaltar que a elucidação da fisiopatologia dos envenenamentos é fundamental para o avanço na terapia dos acidentes ofídicos. O estudo dessas peçonhas vem contribuindo para o conhecimento de diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, destacando-se a estrutura e a função dos receptores nicotínicos, a cascata de coagulação sanguínea, a fibrinólise, o processo inflamatório e a vasoconstrição (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

O presente trabalho traz novas contribuições para a elucidação e determinação da composição bioquímica das peçonhas animais, possibilitando um maior entendimento dos mecanismos de ação destas toxinas nos

envenenamentos. Estudos futuros de elaboração de fármacos podem resultar na utilização direta destas proteínas, ou de parte delas para a elaboração de modelos sintéticos.

2. OBJETIVOS

- ✓ Isolar uma PLA₂ ácida por três etapas cromatográficas (troca iônica, exclusão molecular e interação hidrofóbica).
- ✓ Caracterizar Estruturalmente: determinar o peso molecular, ponto isoelétrico e a sequência N-terminal.
- ✓ Realizar a caracterização Enzimática: atividade fosfolipásica dose-dependente e efeitos da temperatura e pH sobre a atividade enzimática. modificação química de His48 com BPB; efeito de íons metálicos divalentes e EDTA para se estudar o mecanismo de ação dependente ou não da atividade enzimática.
- ✓ Realizar a caracterização Farmacológica e Tóxica: atividades anticoagulante, miotóxica, indução de edema e citotoxicidade sobre células tumorais e microrganismos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material

Colágeno bovino (tipo I) foi adquirido da Chrono Log Corporation. Os reagentes adenosina 5'-difosfato (ADP), brometo de *p*-bromofenacila (BPB), Acil 6:0 NBD-fosfolipídios, NBD-fosfatidilcolina (PC), NBD-fosfatidilglicerol (PG), NBD-fosfatidiletanolamina (PE) ou ácido fosfatídico (PA) foram adquiridos de Avanti Polar Inc., Alabastro, AL, EUA. Resinas DEAE-Sepharose, Sephadex G-75 e Phenyl-Sepharose foram adquiridas da Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2. Animais

Camundongos *Swiss* machos, pesando entre 18-25 g, foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto-SP, Brasil. Os cuidados com animais foram realizados de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo (n^o 07.1.895.53.7) e Instituto Brasileiro do meio ambiente (IBAMA) (11781 -1/11-11-2007).

3.3. Obtenção da peçonha

A peçonha da serpente *Bothrops moojeni* foi adquirida do Serpentário Bioagents, em Batatais-SP, sob responsabilidade da bióloga Alexandra Jardim Sandrin. Após a coleta, a peçonha foi imediatamente dessecada a vácuo em temperatura ambiente e conservada a -20°C até o momento do uso.

3.4. Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops moojeni*

Cerca de 200 mg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foram dissolvidos em 2,0 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH 7,8, centrifugados a 10.000xg por 10 min em temperatura ambiente e o sobrenadante aplicado a uma coluna de DEAE-Sepharose (1,5 X 15 cm). As amostras foram eluídas com um gradiente linear de concentração de bicarbonato de amônio (0,05 - 0,3 M) pH 7,8. As frações, contendo 3,0 mL cada, foram coletadas em um fluxo de 20 mL/hora, por um coletor de frações (Pharmacia Biotech). As absorbâncias de cada fração foram monitoradas em comprimento de onda 280 nm, num espectrofotômetro Thermo Spectronic (Genesys). Em seguida um gráfico foi construído, usando o programa Originlab, sendo as amostras delimitadas, reunidas em “pools”, dosadas, liofilizadas e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

3.5. Cromatografia de exclusão molecular da fração E3 em gel Sephadex

G-75

A terceira fração da cromatografia anterior, denominada E3, depois de liofilizada, foi ressuspensa em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8 e aplicada a uma coluna de Sephadex G-75 (1,0 X 100 cm). As frações, contendo 3,0 mL cada, foram coletadas num fluxo de 20 mL/hora. A absorbância de cada fração foi aferida em 280 nm.

3.6. Cromatografia de interação hidrofóbica em resina Phenyl-Sepharose

A segunda fração resultante da cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75), denominada E3G2, foi ressuspensa em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,5 e NaCl 4 M e aplicada em coluna (10 x 0,6 cm) contendo Phenyl-Sepharose CL-4B, previamente preparada e equilibrada à temperatura ambiente com o mesmo tampão. As amostras foram coletadas a 3,0 mL/tubo, num fluxo de 20 mL/h, com gradiente decrescente de NaCl (4-0 M) em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,5 e H₂O destilada. A absorbância de cada fração foi acompanhada à 280 nm. As frações resultantes foram delimitadas e avaliadas quanto ao grau de pureza e atividade enzimática.

3.7. Determinação quantitativa de proteínas

Para quantificar as proteínas presentes nas amostras utilizadas, soluções contendo de 0,1 a 2,0 mg de proteínas foram submetidas à dosagem

pelo método do microbiureto, conforme descrito por Itzhaki e Gill (1964). A curva padrão foi construída utilizando-se soroalbumina bovina, que apresenta um coeficiente de extinção a 1,0 mg/mL em 278 nm de 0,666 (DOTY, 1953).

3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes e determinação do peso molecular aparente

Esta atividade foi realizada segundo metodologia descrita por Laemmli (1970), com modificações conforme descrito a seguir. O gel de resolução a 12% (m/v) em acrilamida (bis-acrilamida: acrilamida, 1:19 m/m) foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 8,8 e SDS 10%. O gel de concentração a 6% em acrilamida foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 10%. Amostras de proteína ou peçonha bruta foram dissolvidas em salina tamponada em fosfato (PBS), acrescidas de 4 µL de tampão para amostras, Tris-HCl 0,5 M, pH 6,5 contendo azul de bromofenol (0,01%), SDS (2%) e glicerol (10%), e submetidas a fervura em 100°C por 4 minutos. As amostras da proteína foram preparadas na presença ou ausência de tampão desnaturante contendo β-mercaptoetanol que foi adicionado ao tampão de amostra a 3,5%.

A solução tris base 0,1 M, EDTA 7,8 mM, glicina 0,77 M e SDS 0,3% (m/v) pH 8,3 foi utilizada como tampão para o cátodo e a mesma solução para o ânodo. A corrida foi realizada à 15 mA e 150 V por aproximadamente 3 horas.

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado por 10 minutos em azul de coomassie G-250 0,1% (p/v) dissolvido em água: metanol: ácido acético (40:

50: 10 v/v) e descorado em ácido acético 10%, sendo, em seguida, documentado em scanner.

As proteínas utilizadas como padrões de pesos moleculares e suas respectivas massas moleculares relativas foram: Albumina bovina (66.000), albumina de ovo (45.000), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho (36.000), anidrase carbônica bovina (29.000), tripsinogênio de pâncreas bovino (24.000), inibidor de tripsina de soja (20.100) e α -lactalbumina de leite bovino (14.200). A mobilidade eletroforética relativa de cada banda foi determinada em centímetros e a massa molecular foi calculada, relacionando-se a mobilidade eletroforética relativa com o logaritmo das massas moleculares das proteínas do padrão.

3.9. Focalização isoeletrica

O ponto isoeletrico (pI) foi determinado por focalização isoeletrica, segundo o método descrito por Vesterberg (1972), em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Eliane Candiani Arantes, FCFRP-USP, Ribeirão Preto, SP. 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. O gel foi colocado sobre uma placa refrigerada ligada a um banho a temperatura de 8°C. Cinco tiras de papel Whatman número 3 sobrepostas foram utilizadas para conectar o gel e os eletrodos, sendo o cátodo embebido em uma solução de NaOH 1 M e o ânodo em ácido fosfórico 1 M. A fonte de alta voltagem foi ajustada para valores de

100 V, 40 mA e então realizada uma pré-focalização por 30 minutos. Pedacos de papel da LKB de 1,0 x 0,5 cm foram embebidos nas amostras e colocados sobre o gel, sendo retirados após 30 minutos de focalização em 250 V e 40 mA. A focalização prosseguiu por mais 2 horas a 750V e 40 a 2mA, e por 1 hora e 20 minutos em 150V e 5 a 0mA.

3.10. Sequenciamento N-terminal

O sequenciamento N-terminal foi realizado por degradação de Edman, utilizando-se um sequenciador automático PPSQ-33A (Shimadzu) segundo descrito por Rodrigues et al., 2007. Os aminoácidos feniltioidantoina derivados (PTH-aminoácidos) foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos 20 PTH-aminoácidos padrão. A sequência obtida foi comparada com as sequências de outras proteínas relacionadas na base de dados SWISS-PROT/TREMBL usando o programa BLAST FASTA (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e outros programas. O sequenciamento foi realizado em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Eliane Candiani Arantes, FCFRP-USP, Ribeirão Preto, SP.

3.11. Espectrometria de massa

A massa molecular da BmooTX-I em condições reduzidas (monômero) e não reduzidas (dímero) foi determinada por espectrometria de massas MALDI TOF (TOFSpec SE, Micromass, UK). As amostras (30–50 pmol/μL) foram dissolvidas em 0,1% (v/v) TFA em água. O ensaio constou de matriz ácida α -

ciano-4-hidroxicinâmico ou ácido 2,5-dihidroxibenzóico. Soluções contendo PLA₂ da peçonha da serpente *B. jararacussu*, BthTX-I (Mr. 14.088,1), ovalbumina (Mr. 44.400,0) e soro albumina bovina (BSA, Mr 66.430,0) foram usadas para calibrar a escala de massa. Os valores atribuídos aos resíduos de aminoácidos representam valores médios (STÁBELI et al., 2006). Esta atividade foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Rodrigo Stábili, Unir, Porto Velho, RO.

3.12. Atividade hemolítica indireta (fosfolipásica em gel)

A atividade fosfolipásica foi testada pelo método de hemólise radial indireta, realizado em placas, como descrito por Gutiérrez et al. (1988), substituindo a agarose por ágar. O experimento consiste na elaboração de um gel (CaCl₂ 0,01 M; gema de ovo 1:3 v/v; PBS (solução salina tamponada em fosfato), pH 7,2; eritrócitos 1:3 v/v PBS; ágar bacteriológico 1%; azida de sódio 0,005% sendo o volume final completado com PBS e o meio vertido em placas em temperatura de 45-50°C. Após a solidificação do gel, foram feitos orifícios de tamanho uniforme (aproximadamente 0,5 cm de diâmetro) e aplicaram-se as amostras a um volume final de 40 µL de peçonha ou PLA₂ diluídas em PBS com diferentes concentrações.

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

O sangue humano utilizado durante os testes foi imediatamente diluído em tampão PBS (30 mL) e as células lavadas 3 vezes com centrifugações de 400xg por 10 minutos, para volumes aproximados de 10mL de sangue. Após as centrifugações, o plasma foi desprezado e as células foram utilizadas na composição do gel.

3.13. Determinação da dose hemolítica indireta mínima (DheM)

A quantidade de enzima (μg) que foi considerada como a DheM foi a concentração responsável pela formação de um halo de aproximadamente 20mm de diâmetro na atividade hemolítica indireta. Após a determinação da dose hemolítica indireta mínima, foram realizados ensaios de caracterização enzimática diversificando variáveis como pH e temperatura, além da interação com íons catiônicos e inibidores.

3.14. Atividade fosfolipásica sobre lipídios fluorescentes

Preparação de lipídios fluorescentes: Lipídios fluorescentes em pó (fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), ácido fosfatídico (PA) e fosfatidiletanolamina (PE)) foram reconstituídos em 100 μL de clorofórmio 100%, distribuídos em tubos de vidro e, em seguida, secos sobre um baixo fluxo de N_2 . Os lipídios secos foram então dissolvidos em 150 mM de NaCl, sonificados quatro vezes a 4°C em intervalos de 1min até a obtenção de uma solução límpida. Uma solução estoque de lipídios de 1 mg/mL foi então preparada e utilizada nos testes. A atividade fosfolipásica da enzima foi

avaliada por intensidade de fluorescência, utilizando-se como substrato acil-NBD. Os testes foram realizados com um volume final de 3,0mL em espectrômetro de fluorescência (Hitachi F450) a temperatura ambiente. A excitação e emissão de comprimento de onda foram ajustadas para 460 nm e 543 nm, respectivamente. A reação padrão continha Tris-HCl 50 mM, CaCl_2 1 mM, pH 7,5. Uma leitura prévia no tempo de 2 min foi realizada com todos os componentes exceto com a enzima. A atividade enzimática foi então iniciada através da adição da PLA_2 ácida e uma segunda leitura, após 12 min, foi realizada. Para corrigir traços de contaminações indesejáveis nas amostras, o tempo inicial de leitura foi subtraído da leitura da amostra contendo a PLA_2 antes da análise dos resultados. Quando necessário, a mudança ocorrida na intensidade da fluorescência foi convertida para nmoles de produto por minuto (nmoles/min) utilizando uma curva de calibração, preparada hidrolisando-se completamente uma solução de substrato através do tratamento com hidróxido de sódio (RODRIGUES et al., 2007). A influência de cátions foi estudada em solução contendo Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 trocando-se o Ca^{2+} por outros íons divalentes como Ba^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} (concentração final de 5 mM). Para experimentos realizados na ausência de Ca^{2+} , uma concentração final de 10 mM de EDTA foi utilizada. A influência do pH também foi avaliada, incubando a PLA_2 em tampões com diferentes valores de pH (3,5-12,5). Esta atividade foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. André L. Fuly, UFF, Niterói, RJ.

3.15. Atividade anticoagulante

O efeito da toxina sobre o tempo de calcificação do plasma foi avaliado utilizando-se plasma bovino doado pelo Matadouro municipal de Ribeirão Preto. A determinação do tempo de calcificação, após incubação de 200 µL de plasma com PBS ou fosfolipase isolada da peçonha (1 a 20 µg) a 37°C por 1 ou 10 min, foi feita cronometrando-se o tempo a partir da adição de 0,05 mL de cloreto de cálcio 0,25 M (ALVARADO; GUTIÉRREZ, 1988).

3.16. Efeito sobre plaquetas

Plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado a partir de sangue de coelho citratado, centrifugado (380xg/12 min) a temperatura ambiente. As plaquetas lavadas (WRP) foram preparadas a partir de sangue coletado com 5 mM de EDTA. A agregação plaquetária foi medida turbidimetricamente usando um agregômetro (Chrono-Log Corporation). Os ensaios foram feitos a 37°C usando 200 µL de PRP ou WRP e após pré-incubação de 2 min com diferentes concentrações da enzima na presença de cálcio (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; FULY et al., 2004). Para a realização dos experimentos, foram adicionados os indutores de agregação plaquetária ADP e colágeno. Este experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. André L. Fuly, UFF, Niterói, RJ.

3.17. Liberação de Prostaglandina I₂ (PGI₂)

Células endoteliais foram obtidas de veias umbilicais humanas (HUVECs) através de digestão por collagenase. Células entre a primeira e a terceira passagem em monocamadas confluentes (25.000 células / poço) foram incubadas com a PLA₂ por 1 ou 24h. Em cada experimento, pelo menos, 250 células foram examinadas. HUVECs sem soro fetal bovino (SFB) 10% foram utilizados como controle positivo. Após o tratamento das HUVECs com BmooTX-I (8 mg/mL), ou 1 IU/mL de trombina (controle positivo) por 1h, o meio foi removido e as células cultivadas por 24h em RPMI contendo FBS 10%. O sobrenadante foi removido após 1h e 24h e centrifugado por 10 min a 400xg a 4°C. Os níveis de 6-ceto-prostaglandina F1a (metabólito estável de prostaglandina I₂) foram medidos por ELISA através do kit comercial 6-ceto-prostaglandin F1a (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, E.U.A.). Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. André L. Fuly, UFF, Niterói, RJ.

3.18. Atividade miotóxica

Em grupos de 04 camundongos machos Swiss (18-22 g) foram injetados no músculo gastrocnêmio direito diferentes doses (µg) de peçonha bruta e proteína isolada, dissolvidas em 50 µL de PBS. Os controles receberam somente PBS e, três horas depois, o sangue dos camundongos foi coletado, por corte na extremidade da cauda, em capilares heparinizados e imediatamente centrifugado a 3.000xg por 10 minutos.

A atividade da enzima creatina cinase (CK) foi determinada utilizando-se 4 µL de plasma com 1,0 mL de reativo do Kit CK-UV K010 (Bioclin) cinético incubados por 3 minutos a 37°C e realizando-se leituras a 340 nm após 3 minutos.

A atividade creatina cinase foi expressa em unidades/litro, sendo que uma unidade consiste no resultado da fosforilação de um nanomol (nmol) de creatina por minuto (SOARES et al., 2000a). A determinação cinética da creatina cinase se baseia segundo as reações a seguir:

Onde: CK → Creatina Cinase.

HK → Hexocinase.

G-6-PDH → Glicose-6-Fosfato Desidrogenase.

Através desse método mede-se fotometricamente a velocidade de redução do NADP⁺ a NADPH, cuja concentração é diretamente proporcional à atividade da creatina cinase no plasma.

3.19. Análise histopatológica das fibras musculares

A atividade miotóxica foi avaliada também por alterações morfológicas induzidas por injeções intramusculares (i.m.) da peçonha bruta (20 µg) ou da PLA₂ (50 µg) no músculo gastrocnêmio direito de camundongos Swiss (18-22 g, n = 4). Após 24h, os animais foram eutanasiados por inalação de dióxido de carbono e uma secção pequena da região central do músculo foi retirada e embebida em solução fixadora (formaldeído 10% em PBS, v/v). O material foi desidratado através do aumento das concentrações de etanol e posteriormente incluído em parafina. Os blocos resultantes foram cortados em secções grossas de 2,5 µm, corados com hematoxilina-eosina 0,25% (m/v) e examinados sob um microscópio óptico (RODRIGUES et al., 2001). Este experimento foi realizado em colaboração com os Professores. Dr. Fabio de Oliveira e Dr. Marcelo Emílio Beletti, UFU, Uberlândia, MG.

3.20. Análise ultra-estrutural da lesão tecidual induzida por BmooTX-I

Para a avaliação ultra-estrutural (BOZZOLA, 1998), fragmentos de 1 a 2 mm³ de músculos gastrocnêmio de camundongos da raça Swiss, inoculados com 50 µg de BmooTX-I, foram coletados e em seguida fixados em glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2. Após fixação por 24 a 48 horas, os fragmentos foram lavados em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,2) e então pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% (30 minutos) e em tetróxido de ósmio a 1% mais ferrocianeto de potássio a 1,25% (mais 30 minutos). Em seguida, os fragmentos de órgãos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) e incluídos em resina Epon 812

(Fluka, Suíça) para posterior corte em ultramicrotomo com obtenção de cortes ultrafinos de 60 nm que foram depositados em tela de Cobre de 250 “mesh”. Estes foram contrastados com acetato de uranila (Merk, Darmstadt, Alemanha) e citrato de chumbo (Merk, Darmstadt, Alemanha) e analisados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 (Zeiss, Alemanha). Este experimento foi realizado em colaboração com os Profs. Drs. Fabio de Oliveira e Marcelo Emílio Beletti, ambos da UFU, Uberlândia, MG.

3.21. Atividade Citotóxica

3.21.1. Sobre células microbiais

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* foram dispersas em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,4 contendo peptona 1%. Microrganismos foram colhidos a partir de pratos de ágar e ajustados para 4×10^5 UFC/mL, e utilizados como alvos para determinar atividade microbicida. Para isso, 4×10^5 células foram incubadas com diferentes concentrações de MjTX-II e BmooTX-I por 30 min a 37°C, em PBS, acrescido de peptona 1%. Microrganismos sobreviventes foram contados pela técnica de diluição em placa como descrito anteriormente por Soares et al. (2000b; c).

3.21.2. Sobre células tumorais de camundongos

A citotoxicidade induzida pelas PLA₂s foi determinada em células de tumor ascítico de Erlich (EAT) em crescimento na cavidade peritoneal de camundongos, segundo método previamente descrito (ROBERTO et al., 2004a). As células EAT foram suspensas em tampão Tyrode-Ringer, na

concentração final de 4×10^6 células/mL e incubadas com diferentes concentrações de enzimas (0-100 μ g) por 30 minutos.

3.21.3. Sobre células tumorais humanas

As enzimas liofilizadas (BmooTX-I e MjTX-II) foram dissolvidas em meio de cultura celular RPMI completo, homogeneizadas, em seguida centrifugadas a 480xg, e esterilizadas por filtração em membranas de 0,22 μ m para a utilização experimental. Como controle positivo, utilizou-se a droga metotrexato (MTX), Macrófagos foram utilizados como controle da atividade da enzima sobre células não tumorais. As células foram plaqueadas e mantidas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar por 24h, sendo então incubadas por mesmo período na presença ou na ausência das PLA₂s ou MTX (1–0,01mg/mL) (ROBERTO et al., 2004a). Para avaliar a atividade citotóxica utilizamos o método de MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) conforme descrito por Mosmann (1983), que avalia as células viáveis após incubação com elemento citotóxico. Todos os testes de citotoxicidade foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Auro Nomizo, FCFRP-USP, Ribeirão Preto, SP.

3.22. Indução de edema

Em grupos de 05 camundongos Swiss machos (18-22 g) foram injetados, via intradérmica (i.d) na região subplantar da pata direita, com 50 μ L de soluções contendo diferentes quantidades da PLA₂ dissolvida em PBS. A leitura das patas foi realizada antes da inoculação das amostras (tempo 0h), e em seguida à injeção das amostras. Foi realizada a mensuração das patas em

diferentes intervalos de tempo (30min, 1h e 3h). Os valores inicialmente obtidos no tempo 0h foram subtraídos aos valores obtidos nos diferentes tempos após as injeções. O aumento da área da pata dos camundongos foi medido com um paquímetro de baixa pressão 0,01 mm (Mytutoyo, Japão) e expresso em porcentagem direta de edema induzido (SOARES et al., 2000a).

3.23. Modificação química

A modificação química de BmooTX-I foi realizada por incubação com BPB (brometo de *p*-bromofenacila) (2 mM, concentração final) dissolvido em dimetilsulfoxido (DMSO) ou etanol (SOARES et al., 2004b). A incubação foi realizada durante 5 ou 24h a 4°C. Em seguida, o excesso de reagente foi removido por cromatografia em fase reversa (RP-HPLC) com coluna C18 ou usando sistema de ultrafiltração (AMICON-YM3). Os testes foram realizados simultaneamente utilizando BmooTX-I ou DMSO.

3.24. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, sendo expressos os resultados pela média +/- desvio padrão (SD) e os níveis de significância considerados dentro do intervalo de confiança $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e Caracterização Bioquímica da PLA₂ ácida tóxica da peçonha de *Bothrops moojeni*

Neste trabalho, uma fosfolipase A₂ ácida, denominada BmooTX-I, foi purificada a partir da peçonha da serpente *B. moojeni* por três passos cromatográficos. Inicialmente foi realizada a cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose, a qual produziu cinco picos principais (Fig. 5A). A fração E3, mostrando alta atividade fosfolipásica, foi fracionada em cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-75, resultando em três picos denominados E3G1, E3G2 e E3G3 (Fig. 5B). Em seguida, a subfração E3G2 foi fracionada em coluna contendo resina de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose CL-4B, resultando em sete novas frações, denominadas P1-P7 (Fig. 5C).

A pureza da PLA₂ isolada foi ainda demonstrada por SDS-PAGE, focalização isoeletrica e espectrometria de massas (Fig. 6). A análise por SDS-PAGE mostrou uma proteína pura de banda polipeptídica única, em presença e ausência de agente redutor β-mercaptoetanol, com massa molecular relativa de 15.000. A focalização isoeletrica também confirmou o elevado grau de pureza da proteína, de ponto isoeletrico 4,2. Pela espectrometria de massas, podemos observar um processo de dimerização da BmooTX-I, com massa de 27.506,38, além de uma diferença entre a massa molecular relativa (resolvida em gel) e a massa real da proteína, que é 13.802, 66 (Fig. 6).

Figura 5: Purificação da PLA₂ ácida da peçonha de *B. moojeni*. (A). Fracionamento de 200 mg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em coluna DEAE-Sepharose (1,5 x 15,0 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8. As amostras foram eluídas num gradiente linear de concentração (0,05-0,3 M) em mesmo tampão, num fluxo de 20 mL/h à temperatura ambiente. Frações de 3 mL foram coletadas por tubo; (B) Cromatografia de exclusão molecular da fração E₃ em resina Sephadex G-75. (1,0 x 100 cm), equilibrada com o tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8. As amostras foram eluídas num fluxo de 20 mL/h à temperatura ambiente; (C) Cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-Sepharose (1,0 x 10 cm). As amostras foram eluídas em um fluxo de 20 mL/h, com gradiente decrescente de NaCl (4-0 M) em Tris HCl 0,01 M, Tris e água destilada, à temperatura ambiente.

Figura 6: Espectrometria de massas, focalização isoeétrica e SDS-PAGE da BmooTX-I:

Espectro MALDI TOF de BmooTX-I reduzida (monômero) e não reduzida (dímero), focalização isoeétrica e SDS-PAGE: Bandas: 1- BmooTX-I na presença de agente redutor β -mercaptoetanol (10 μ g); 2- BmooTX-I não reduzida (10 μ g); 3- Padrão de peso molecular (Sigma Chem. Co): fosforilase b (97.000), albumina de soro bovino (66.000), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36.000), anidrase carbônica (29.000), tripsinogênio (24.000), inibidor de tripsina de soja (20.100), e α -lactalbumina (14.200); 4- peçonha bruta de *B. moojeni* não reduzida.

Os 50 primeiros resíduos de aminoácidos da região N-terminal da BmooTX-I foram sequenciados em um sequenciador automático de aminoácidos. Logo em seguida, a sequência obtida foi comparada com as sequências de outras proteínas relacionadas na base de dados SWISS-PROT/TREMBL usando o programa BLAST FASTA e, então, comparados com a mesma região de outras fosfolipases A₂ de peçonhas de serpentes, conforme mostrado na Figura 7. BmooTX-I, classificada no grupo IIA das fosfolipases A₂ (PLA₂s provenientes de peçonhas de serpentes da família viperidae) demonstrou pertencer ao subgrupo das enzimas que possuem um resíduo de aminoácido aspartato na posição 49 (enzimas Asp49), apresentando portanto atividade catalítica. Além disso, uma alta homologia estrutural pode ser observada, comparando a sequência da BmooTX-I com a de outras enzimas Asp49, apresentando sítios altamente conservados.

	1		50	(identity %)
BmooTX-I	NLWQFEM LIM-KIAKTSGFMFYSSYGCYCGWGGHGRPQDATDRCCFVHDC	**	*	--
<i>B. pictus</i> PLA ₂	SLVQFET LIM-KIAKRSGVWFYGSYGCFCGSGGQGRPQDASDRCCFVHDC			77
BE-I-PLA ₂	SLVQFET LIM-KIAGRSGVWYYGSYGCYCGSGGQGRPQDASDRCCFVHDC			75
BJUPLA ₂	DLWQFGQMIL-KETGKLFPYYTTYGCYCGWGGQGQPKDATDRCCFVHDC			63
BthTX-II	DLWQFGQMIM-KETGKLFPYYTTYGCYCGWGGQGQPKDATDRCCFVHDC			63
BthA-I-PLA ₂	SLWQFGKMIN-YVMGESGVLQYLSYGCYCGLGQGQOPTDATDRCCFVHDC			63
<u>BinTX-I</u>	NLWQFGKMMN-YVMGQSVVYKYFYGYGCYCGWGGIGQPRDATDRCCFVHDC			61
Myotoxin III	SLIEFAKMIL-EETKRLFPYYTTYGCYCGWGGQGQPKDATDRCCFVHDC			59
BJ-PLA ₂	DLWQFGQMMN-DVMREYVVFNYLYYGCYCGWGGIGKPRDATDRCCFVHDC			57
PrTX-III	DLWQFGQMIL-KETGKLFPYYTYGGCYCGVGGRRLGLGTKDDRCCYVHDC			46
	. * : * :: . * ** : ** ** ***** : *****			

Figura 7: Comparação da sequência N-terminal da BmooTX-I com a de outras PLA₂ Asp49 de serpentes do gênero *Bothrops*. *B. pictus* PLA₂ (gi:23396779), BE-I-PLA₂ (*B. erythromelas*, gi:86450426), BJUPLA₂ (*B. jararacussu*, gi:1171971), BthTX-II (*B. jararacussu*, gi:167744839), BthA-I-PLA₂ (*B. jararacussu*, gi:56554155), BinTX-I (*B. insularis*, gi:26006832), Myotoxin III (*B. asper*, gi:166214965), BJ-PLA₂ (*B. jararaca*, gi:3914258), PrTX-III (*B. pirajai*, gi:17865540). Os resíduos de Cisteína nas sequências foram destacados em caixa cinza. O sítio catalítico (*) e o sítio ligante de cálcio (**) em destaque.

4.2. Caracterização Enzimática e Farmacológica

A BmooTX-I apresentou alta atividade fosfolipásica até mesmo em baixas concentrações (0,1 μ g), apresentando atividade máxima com aproximadamente 1,5 μ g (Fig. 8A).

A dose de BmooTX-I considerada como dose hemolítica indireta mínima foi de 1 μ g, quantidade esta responsável pela formação de um halo de aproximadamente 20mm de diâmetro.

Com a DheM estipulada, foram realizados testes para avaliar a estabilidade da BmooTX-I em diferentes valores de pH (Fig 8B) e temperaturas (Fig. 8C), onde foi observado que a enzima se mantém estável em diferentes condições.

Figura 8: Atividade hemolítica indireta de BmooTX-I. **(A)** Atividade PLA₂ de BmooTX-I (0.01-2.0 µg) e peçonha de *B. moojeni* (10µg); **(B)** BmooTX-I (1 µg) incubada (1h) em diferentes valores de pH (37°C); **(C)** BmooTX-I (1 µg) pré aquecida por 1h em diferentes temperaturas. Resultados são apresentados pela média ±SD (n=3).

Diferentes fosfolipídios fluorescentes (NBD-PC, NBD-PG, NBD-PA, NBD-PE) foram analisados como substratos para a atividade da BmooTX-I (Figura 9A), sendo que NBD-PC foi o melhor substrato para esta enzima. Como a intensidade da hidrólise de NBD-PC em relação aos outros substratos (NBD-PG, NBD-PA, NBD-PE) foi maior, este fosfolipídio foi escolhido para a realização de testes para a avaliação da cinética enzimática. A BmooTX-I apresentou atividade em diferentes intervalos de pH, sendo a atividade ótima encontrada em pH próximo a 9,0 (Fig. 9B).

A atividade da BmooTX-I também foi analisada após incubação prévia com diferentes íons divalentes (Fig. 9C). BmooTX-I teve sua atividade potencializada na presença dos íons cálcio e magnésio, mantendo-se estável na presença de outros íons. Para o teste de inibição da atividade catalítica da enzima, utilizou-se o BPB, mostrando que a enzima perde parcialmente esta atividade quando incubada com o inibidor por 5h (Fig. 9D) e totalmente quando incubada por 24h (Dados não mostrados).

Figura 9: Influência do pH, íons metálicos e BPB na hidrólise de substratos NBD. (A)

Hidrólise de lipídios NBD-fluorescentes pela BmooTX-I (12 μ g/mL) após 4 min de incubação em temperatura ambiente: 1-(NBD-PC), 2-(NBD-PG), 3-(NBD-PA) e 4-(NBD-PE); **(B)** Efeito de diferentes valores de pH; **(C)** e cátions divalentes (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Sr^{2+}) sobre a hidrólise de NBD-PC; **(D)** Efeito do tratamento da BmooTX-I com BPB na hidrólise de NBD-PC. Resultados expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

A atividade anticoagulante foi realizada de acordo com o método previamente descrito por Alvarado e Gutiérrez (1988), utilizando plasma bovino citratado. Esta atividade expressa a quantidade de enzima capaz de tornar o plasma incoagulável. Quando incubada com o plasma, BmooTX-I apresentou baixa atividade anticoagulante, sendo que 20 µg de enzima foi capaz de tornar 200 µL de plasma incoagulável.

A BmooTX-I apresentou atividade inibitória dose-dependente sobre a agregação plaquetária em experimentos utilizando como indutores de agregação o ADP e o colágeno, sendo encontrados uma IC₅₀ de 1,3 µg/mL para o colágeno e 2,1 µg/mL para o ADP (Fig. 10A). A enzima perdeu parcialmente sua atividade na presença de BPB quando incubada por 5h (Fig. 10B) e totalmente quando incubada por 24h (Dados não mostrados).

Figura 10: Efeito da BmooTX-I na inibição da agregação plaquetária. (A) Plaquetas pré incubadas com BmooTX-I (0,1-20 $\mu\text{g/mL}$) após adição de colágeno (●) ou ADP (○); **(B)** BmooTX-I tratada ou não com BPB. Resultados expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

Adicionalmente, foi testada a capacidade da BmooTX-I em induzir a liberação de prostaglandina I_2 através de HUVECs. BmooTX-I aumentou significativamente a liberação de PGI_2 (6-ceto-prostaglandina F1a) pelas HUVECs (Fig. 11). Após 1 e 24h de incubação com BmooTX-I (0,5 mM) ou trombina (1 IU/mL), as concentrações de PGI_2 nos sobrenadantes das HUVECs foram 698 ± 115 e 2.785 ± 252 , ou 11.085 ± 1045 e 13.658 ± 1235 pg/mL, respectivamente; níveis maiores quando comparados aos controles (200 ± 15 por 1h e 3.850 ± 688 por 24h).

Figura 11: Efeito da BmooTX-I na liberação de PGI_2 e expressão por HUVECs após o tratamento com 0,5 mM de BmooTX-I e 1 IU/mL trombina por 1h ou 24h a 37°C. Resultados são expressos pela media $\pm$ SD (n=3).

Assim como a peçonha de *B. moojeni*, a BmooTX-I foi capaz de induzir miotoxicidade (Fig. 12), demonstrando uma drástica mionecrose na análise histopatológica, além da presença de infiltrados leucocitários (Fig. 12C e 12D).

Além disso, a miotoxicidade foi confirmada com a atividade miotóxica *in vitro*, através da medição dos níveis de CK no plasma sanguíneo (Fig. 12A). A BmooTX-I mostrou atividade miotóxica moderada (1655 U/mg) quando comparada com a BthTX-I (2011 U/mg), uma PLA₂-símile Lys49 básica miotóxica isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*.

Em adição, análises realizadas por microscopia eletrônica confirmaram os resultados encontrados por microscopia de luz. Como mostrado na Figura 13B, células musculares de camundongos tratados com BmooTX-I apresentaram diferentes estágios de necrose, em relação às células controle (Fig. 13A), além de edema, caracterizado pela separação das fibras. O dano tecidual foi caracterizado pela completa desorganização das miofibrilas com a presença de infiltrado inflamatório (Fig. 13C), além disso, a BmooTX-I foi capaz de causar um intenso dano à membrana (Fig. 13D).

Figura 12: Atividade miotóxica e análise histopatológica da BmooTX-I. (A) Aumento da creatina cinase (CK) plasmática após injeção intramuscular de BmooTX-I e BthTX-I (50 µg). Os resultados são apresentados pela média $\pm$ S.D. (n=5); (B) Microscopia de luz de cortes advindos do músculo gastrocnêmio de camundongos. Camundongos controle foram injetados apenas com PBS; (C, D) Microscopia de luz de cortes advindos do músculo gastrocnêmio de camundongos 24h após injeções de BmooTX-I (50 µg). As letras indicam a presença de necrose (N) e infiltrado inflamatório (I).

Figura 13: Análise ultra-estrutural de seções transversais do músculo gastrocnêmio de camundongos após tratamento com BmooTX-I ou PBS. Células musculares foram retiradas após 24h da injeção intramuscular de 50 μ g/50 μ L de BmooTX-I ou PBS apenas (controle). **(A)** Miofibrilas normais (3000x); **(B)** Fibras danificadas, após injeção intramuscular de 50 μ g/50 μ L de BmooTX-I, apresentando infiltrado leucocitário, edema intersticial, observado pela separação das fibras (4500x). Note a presença de células inflamatórias **(C)** Evidencia de dano celular após injeção intramuscular de 50 μ g/50 μ L de BmooTX-I (3000x) **(D)** Membrana celular degenerada após injeção intramuscular de 50 μ g/50 μ L de BmooTX-I (12000x). Letras indicam a presença de fibras danificadas (D), além de infiltrado leucocitário (I).

A atividade citotóxica sobre células tumorais da enzima BmooTX-I foi avaliada pelo método de MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) conforme descrito por Mosmann (1983), o qual avalia as células viáveis após incubação com elemento citotóxico. Os controles negativo (célula e meio RPMI) e branco (meio RPMI) também foram mensurados (resultados não apresentados). BmooTX-I apresentou moderada atividade citotóxica sobre linhagens tumorais, sendo esta atividade aumentada em relação à dose (Fig. 14C;D).

Além disso, BmooTX-I também apresentou moderada atividade microbicida, inibindo o crescimento de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (Fig. 14A;B). Assim como a atividade citotóxica sobre células tumorais, BmooTX-I apresentou atividade microbicida de maneira dose-dependente.

Figura 14: Atividade citotóxica da BmooTX-I. Efeito microbicida de BmooTX-I sobre *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* (A) e *C. albicans* (B); MjTX-II foi usado como controle positivo; (C,D) Efeito antitumoral da BmooTX-I sobre diferentes linhagens celulares. Células testadas: EAT (tumor de Ehrlich) (C) e Jurkat (células de leucemia linfoblástica T humana) (D). Como controle positivo utilizou-se a droga antitumoral metotrexato (MTX) e como controle sobre células normais, BmooTX-I foi testada sobre macrófagos. Resultados expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

Os resultados obtidos na atividade de formação de edema estão representados na figura 15. A atividade foi realizada utilizando as enzimas BmooTX-I, MjTX-II e a peçonha bruta de *Bothrops moojeni* nas concentrações de 50 µg. A formação de edema foi aferida nos tempos 30, 60, 120 e 180 minutos, sendo que as maiores atividades foram observadas em todas as amostras após 30 minutos da aplicação, podendo-se observar uma diminuição da atividade com o decorrer do tempo.

Figura 15: Porcentagem de edema induzido. Edema induzido pela peçonha bruta de *B.moojeni*, MjTX-II e BmooTX-I (50 µg) na pata de camundongos Swiss machos pesando entre 18-22 g. Resultados são apresentados pela média $\pm$ S.D. (n=5).

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Embora as peçonhas de serpentes contenham um grande número de proteínas bioativas, as fosfolipases A₂ (PLA₂s) e suas isoformas constituem grande parte dos componentes tóxicos de peçonhas botrópicas (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

Embora os mecanismos de ação das fosfolipases não foram ainda totalmente definidos, estas enzimas parecem apresentar um importante papel em funções fisiológicas, bem como digestão de lipídios, atuar em respostas imunológicas, inflamação, proliferação celular, migração celular e vasoconstrição (HANADA et al., 1995; BUCKLAND; WILTON, 2000).

No presente trabalho, uma fosfolipase A₂ ácida e tóxica foi purificada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* por três passos cromatográficos (troca iônica, exclusão molecular e interação hidrofóbica).

Inicialmente, a peçonha bruta foi aplicada a uma coluna de troca aniônica DEAE-Sepharose, a qual separa as proteínas pela diferença de cargas apresentando cargas positivas que atraem ânions. A cromatografia foi iniciada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M e as proteínas de menor afinidade pela coluna são eluídas primeiro, enquanto as outras permanecem retidas. O aumento da concentração do sal no tampão facilita a eluição das proteínas que ficaram retidas, pois os íons do sal competem com as proteínas pela ligação com a resina.

A fração E3, derivada da cromatografia de troca iônica foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G-75. O

método de filtração em gel é baseado no efeito de peneira molecular, sendo usado para a separação de substâncias de acordo com o tamanho e forma moleculares.

Logo em seguida, a fração com maior atividade fosfolipásica, denominada E3G2 foi fracionada em coluna de interação hidrofóbica. O mecanismo da interação hidrofóbica ocorre por meio de ligações entre grupos hidrofóbicos da proteína e grupos localizados na matriz de separação, características estas, que contribuíram para a aplicação e padronização da metodologia utilizada para o isolamento da enzima. A PLA₂, denominada BmooTX-I, foi isolada em sistema cromatográfico contendo NaCl (4M), o qual promoveu a exposição dos grupos hidrofóbicos presentes na molécula. Assim, a alta afinidade da enzima pela matriz foi observada após a aplicação de um gradiente decrescente de NaCl (4-0M), seguido por Tris-HCl 0,01M e por fim água destilada, sendo que a proteína foi eluída em água (Fig. 5C).

Várias PLA₂s provenientes de peçonhas botrópicas têm sido purificadas através da utilização de uma combinação de métodos cromatográficos, tais como: gel de filtração, troca iônica, RP-HPLC, interação hidrofóbica e colunas de afinidade contendo ligantes naturais como heparina ou anticorpos (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997; GEOGHEGAN et al., 1999; OWNBY et al., 1999; ANDRIO-ESCARSO et al., 2002; SOARES et al., 2002, 2004a, b; RODRIGUES et al., 2007; COSTA et al., 2008; CALGAROTTO et al., 2008).

A comparação da sequência N-terminal da BmooTX-I mostrou similaridade com outras PLA₂s de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* (Fig. 7), apresentando aminoácidos altamente conservados no alinhamento

múltiplo das sequências, tais como resíduos de cisteína, que estão envolvidos na formação de pontes dissulfeto (COGO et al., 2006). Vários outros resíduos conservados, importantes para a atividade catalítica da PLA₂, como os que compõem o sítio catalítico (D₄₂XCCXXHD₄₉), e o sítio ligante de cálcio (X₂₇CGXGG₃₂) (KUDO; MURAKAMI, 2002), fazem parte da sequência destas PLA₂s do grupo II provenientes de peçonhas de serpentes, apresentam-se conservados também na BmooTX-I.

Uma substituição de um resíduo de aminoácido no canal hidrofóbico foi encontrada na BmooTX-I, em que o Trp19, reportado como parte da superfície ligante interfacial (SOARES et al., 2004a; COSTA et al., 2008), é substituído por um resíduo Met19. Nota-se, porém, que essa substituição é conservativa, pois tanto o triptofano quanto a metionina são aminoácidos hidrofóbicos, o que parece não interferir no canal hidrofóbico, consequentemente mantendo a atividade miotóxica da BmooTX-I.

As sequências completas de mais de 150 PLA₂s, a maioria delas a partir de peçonhas de serpentes, foram determinadas (CALGAROTTO et al., 2008; COSTA et al., 2008; DIZ FILHO et al., 2009). Todas as svPLA₂s possuem entre 120-135 resíduos de aminoácidos, contendo várias pontes dissulfeto e conservando uma estrutura global que define a estrutura das PLA₂s. Todas as svPLA₂s são enzimas Ca²⁺ dependentes, e os resíduos do loop ligante de Ca²⁺ e do sítio catalítico são particularmente bem conservados.

A atividade fosfolipásica da BmooTX-I foi testada através da atividade hemolítica indireta e da atividade sobre lipídios fluorescentes. A atividade hemolítica indireta temperatura-dependente mostra que a enzima BmooTX-I é

ativa em todas as temperaturas testadas (Fig. 8C), sendo este resultado consistente com a literatura, que mostra que PLA₂s são enzimas termoestáveis (PONCE-SOTO et al., 2002).

Logo em seguida, a atividade PLA₂ da BmooTX-I foi testada em relação ao pH. BmooTX-I foi previamente incubada em soluções de pH variando de 2,5 a 10, sendo que a enzima também apresentou alta estabilidade em todos os pHs testados (Fig. 8B). Em pHs entre 3,5 e 4,5, houve um decréscimo na atividade da enzima, o que pode ser explicado pela proximidade destes valores ao pI da BmooTX-I, provocando a precipitação da proteína. A alta estabilidade de PLA₂s provenientes de peçonhas de serpentes, incluindo BmooTX-I, é explicada provavelmente devido aos seus tamanhos relativamente pequenos (aproximadamente 121 resíduos de aminoácidos) e a presença de 7 pontes dissulfeto em suas estruturas (COSTA et al., 2008). Como dito anteriormente, as fosfolipases A₂ provenientes de peçonhas de serpentes são proteínas usualmente pequenas, contendo de 5 a 8 pontes dissulfeto (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

Além de suas funções farmacológicas, svPLA₂s apresentam também uma vasta gama de substratos preferenciais, que devem ser determinados pela superfície específica ou topologia da região da proteína que interage com a superfície da membrana. Nos grupos I/II das PLA₂s, esta região é definida por uma superfície hidrofóbica em fenda altamente conservada, que se liga à cadeia acil-éster do substrato fosfolipídico juntamente com um anel em torno de variáveis resíduos polares e carregados, formando o sítio de reconhecimento interfacial (RAMIREZ; JAIN, 1991), ou a face “i”. As variações na topologia da face “i” determinam a especificidade do fosfolipídio ligante do

grupo-cabeça (SNITKO et al., 1999, YU et al., 2000), e pode dar origem a novos e inesperados efeitos catalíticos. Por exemplo, a PLA₂ neutra da peçonha de *Naja n. atra* exibe o fenômeno de “ativação PC” (ADAMICH; DENNIS, 1978), em que a hidrólise de fosfolípidios contendo grupos cabeça etanolamina é reforçada em membranas que incluem fosfatidicolina (PC). Esse efeito é determinado pela ligação do grupo-cabeça da PC com um *cluster* de resíduos na superfície, perto do sítio ativo na região face “i” (LEFKOWITZ et al., 1999).

A atividade enzimática sobre lipídios fluorescentes demonstrou que a BmooTX-I hidrolisa diferentes fosfolípidios como fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), ácido fosfatídico (PA) e fosfatidiletanolamina (PE) com maior especificidade sobre a fosfatidilcolina (PC) (Fig. 9A), assim como foi observado também no trabalho realizado por Rodrigues e colaboradores (2007) com a fosfolipase A₂ ácida tóxica BpPLA₂, purificada da peçonha de *B. pauloensis*. A partir deste resultado, NBD-PC foi o fosfolípido utilizado como padrão para estudar a influência do pH e metais sobre a atividade de BmooTX-I.

A enzima foi capaz de hidrolisar a PC em uma grande faixa de valores de pH, sendo a atividade ótima observada em valores próximos a 8,0 (Fig. 5B). A Figura 5C mostra a influência de cátions divalentes na hidrólise de NBD-PC pela BmooTX-I, mostrando uma atividade mais pronunciada sobre a PC na presença de Ca²⁺ em relação aos demais íons testados. Na presença de outros metais (Ba²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ e Sr²⁺) uma notável redução na atividade foi observada (Fig. 5C) e com a adição de 10mM de EDTA ao meio, nenhuma atividade PLA₂ foi observada (dados não mostrados). A inibição da atividade

enzimática por EDTA demonstrou a importância de íons metálicos divalentes, provavelmente o cálcio, para a atividade desta proteína (VERHEIJ et al., 1980; ARNI; WARD, 1996; 2002).

As PLA₂s enzimaticamente ativas requerem cálcio para a estabilização da conformação catalítica do sítio ligante de cálcio, o qual é formado por um grupo β -carboxílico contendo Tyr28, Gly30 e Gly32. Duas moléculas de água completam estruturalmente a esfera de coordenação do cálcio, formando assim uma bi-pirâmide pentagonal (SCOTT et al., 1990). O resíduo de Asp na posição 49 é essencial para a ligação do cálcio à proteína. Além disso, a substituição conservativa de Asp49 por Glu49 promove uma redução de 12 vezes na afinidade da enzima por íons cálcio, com uma concomitante diminuição na atividade catalítica (LI et al., 1994).

BmooTX-I foi capaz de inibir a coagulação do plasma citratado. PLA₂s ácidas e básicas geralmente apresentam atividade anticoagulante (HIGUCHI et al., 2006). A capacidade característica das PLA₂s de se ligarem e clivarem fosfolípidios de membrana indica que PLA₂s de peçonhas de serpentes inibem a coagulação do sangue através da destruição de fosfolípidios pró-coagulantes (KINI; 2003; CHIOATO; WARD, 2003).

Um grande número de PLA₂s de peçonhas de serpentes exibem propriedades anticoagulantes (OUYANG et al., 1992). Na concentração de 66 ng/mL, bID-PLA₂ uma PLA₂ purificada da peçonha de *Bothrops leucurus* foi capaz de inibir a coagulação do plasma (HIGUCHI et al., 2006). Já Díaz e colaboradores (1995) isolaram uma PLA₂ básica da peçonha de *B. asper*, a

qual apresentou atividade anticoagulante apenas na concentração de 40 mg/mL ou superior.

O efeito sobre a agregação plaquetária também foi testado, e a BmooTX-I foi capaz de inibir a agregação induzida pelo colágeno e ADP de maneira dose-dependente (Fig. 10A). Muitas toxinas de peçonhas de serpentes afetam as funções plaquetárias (ANDREWS; BERNDT, 2000). Elas podem ser agrupadas em cinco grandes famílias: enzimas tipo serinoproteases, metaloproteases zinco dependentes das classes PI a PIV da família das reprotinas e as isoenzimas PLA₂s do grupo II, além das proteínas sem atividade enzimática, como, Lectinas do tipo-C, CRISP e desintegrinas (WISNER et al., 2002; JUÁREZ et al., 2004).

Muitas PLA₂s ácidas que mostraram-se inibidoras da agregação plaquetária já foram purificadas, bem como LM-PLA₂-I e II de *Lachesis muta* (FULTON et al., 2000; 2002), BE-I-PLA₂ de *B. erythromelas* (MODESTO et al., 2006) e Bp-PLA₂ de *B. pauloensis* (RODRIGUES et al., 2007). Dependendo do seu efeito sobre plaquetas, as PLA₂s de peçonhas de serpentes podem ser divididas em três grupos: classe A, a qual inclui as fosfolipases capazes de induzir a agregação plaquetária; classe B, PLA₂s que inibem a agregação plaquetária, induzida por vários agonistas fisiológicos; classe C, PLA₂s que apresentam resposta bifásica sobre plaquetas (possuem propriedades pró e anti-agregante) (KINI; EVANS, 1997). De acordo com esta classificação, BmooTX-I pode ser classificada na classe B das fosfolipases que possuem ação sobre plaquetas.

Algumas PLA₂s interferem na agregação plaquetária por clivarem fosfolipídios presentes na membrana de plaquetas liberando ácido araquidônico e formando seus metabólitos, como a prostaciclina (prostaglandina I₂), substância que atua na inibição da agregação plaquetária, e o tromboxano, composto que atua na ativação da agregação plaquetária (FULY et al., 2003; 2004)

BmooTX-I significativamente aumentou a liberação de PGI₂ (6-ceto-prostaglandina F1a) por HUVECs (Fig. 11). Após incubação com BmooTX-I (0,5mM) ou trombina (1IU/mL), as concentrações de PGI₂ nos sobrenadantes de HUVECs foram aumentados.

O endotélio saudável é uma interface metabolicamente ativa entre o sangue e tecidos extravasculares. Células endoteliais produzem uma variedade de fatores envolvidos no controle do tônus vascular, ativação plaquetária e crescimento celular. Os mais importantes fatores são o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI₂) (BUSSE et al., 1994). Gryglewski (1995) também indicou que PGI₂ e o NO apresentam um papel crucial na manutenção da tromborresistência e tônus da parede vascular.

No presente trabalho, a miotoxicidade da BmooTX-I foi avaliada através dos níveis de atividade da creatina cinase (CK) plasmática de animais injetados com a enzima e sua confirmação deu-se por análises histológicas utilizando microscopia óptica (Fig. 12) e ultraestrutural (Fig. 13). A creatina cinase é uma enzima do metabolismo energético muscular que em casos de lesão celular é liberada e pode ser detectada no plasma, como um marcador. A BmooTX-I, induziu aumento da atividade CK (Fig. 12A), constituindo assim uma exceção,

em relação às demais PLA₂s ácidas descritas, pois, de acordo com resultados anteriores, apesar de altamente catalíticas, essas moléculas normalmente não apresentam toxicidade (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; ROBERTO et al., 2004a; b; MODESTO et al., 2006), dissociando atividade catalítica e miotoxicidade.

Atualmente, vários estudos têm sugerido que PLA₂s miotóxicas podem induzir dano muscular afetando a integridade da membrana plasmática, deste modo, levando a uma hipercontração e outros efeitos intracelulares (FULTY et al., 2003). A BmooTX-I foi capaz de danificar membranas de células musculares (Fig. 13D). Essas membranas são formadas por vários tipos de fosfolípidios, principalmente fosfatidilcolina, a qual, como já constatado, é o substrato preferencial da BmooTX-I, liberando ácidos graxos e lisofosfolípidios e causando dano celular.

O efeito tóxico destas enzimas ácidas foi observado pela primeira vez por Nisenbom et al. (1986), que mostraram que uma PLA₂ ácida da peçonha de *Bothrops alternatus* causa graves danos em fígado, pulmões e coração. Ainda hoje, o mecanismo de toxicidade das fosfolipases não está totalmente elucidado. Segundo alguns autores, a miotoxicidade de fosfolipases A₂-símiles Lys49 parece estar relacionada a um segmento catiônico e hidrofóbico (resíduos 115 a 129) presente na região C-terminal destas enzimas (CHIOATO; WARD, 2003). A utilização de fosfolipases A₂ ácidas tóxicas como ferramentas de estudos de elucidação da toxicidade é hoje uma realidade, pois a comparação entre fosfolipases ácidas não tóxicas (maioria) e tóxicas, de alta similaridade estrutural, possibilitar uma ampliação das informações sobre este assunto.

Proteínas de peçonha de serpentes são consideradas capazes de matar, *in vitro*, *Leishmania* spp. (TEMPONE et al., 2001; TOYAMA et al., 2006; FRANÇA et al., 2007; STÁBELI et al., 2007; SANT'ANA et al., 2008), *Trypanosoma* spp (SANT'ANA et al., 2008), vírus HIV (ZHANG et al., 2003), vírus da dengue (SANT'ANA et al., 2008) e bactérias (NEVALAINEN et al., 2008). BmooTX-I apresentou efeito citotóxico sobre microrganismos de maneira dose-dependente (Fig. 14 A, B). Vários estudos mostram o potencial antimicrobiano de peçonhas de serpentes neotropicais, especialmente daquelas do gênero *Bothrops* (PÁRAMO et al., 1998; RODRIGUES et al., 2004; STÁBELI et al., 2006). No geral, peçonhas de serpentes das famílias Elapidae e Viperidae são as mais ativas contra bactérias (STILES et al., 1991).

Do mesmo modo, BmooTX-I mostrou-se tóxica sobre linhagens tumorais humanas e de camundongos, sendo menos citotóxica sobre linhagens de células normais (macrófagos) (Fig 14C, D). As miotoxinas de *B. brazili* (MTX-I e II) apresentaram atividade citotóxica contra a linhagem tumoral Jurkat, atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *C. albicans*, e atividade parasiticida contra *Leishmania* spp (COSTA et al., 2008). PLA₂s isoladas das peçonhas de *Bothrops neuwiedii* e da cobra indiana *Naja naja* demonstraram ser citotóxicas sobre linhagens de melanoma B16F10 e tumor ascídico de Ehrlich, respectivamente, sugerindo o emprego de PLA₂s como potentes drogas anti-câncer (BASAVARAJAPPA; GOWDA; 1992)

Alguns autores propõem que a atividade citotóxica sobre linhagens de células tumorais está associada com a indução de apoptose, considerando que PLA₂s supostamente agem como mediadores de apoptose em vários modelos, incluindo diferentes linhagens celulares (CUMMINGS et al., 2000). Estudos

indicam que a atividade fosfolipásica aumenta a movimentação de fosfolipídios, o que pode levar a mudanças em membranas durante a apoptose (PANINI et al., 2001).

A BmooTX-I também foi capaz de induzir edema na pata de camundongos em baixas concentrações (Fig. 15). A inflamação local é uma característica do envenenamento por serpentes das subfamílias Viperinae e Crotalinae (DENNIS, 1994). O mecanismo pelo qual PLA₂s cataliticamente ativas induzem edema pode ser explicado provavelmente devido à liberação dos precursores de eicosanóides resultantes da hidrólise de fosfolipídios. A liberação de aminas biogênicas por mastócitos foi proposta também como um possível mecanismo de indução de edema por PLA₂s (LANDUCCI et al., 1998, 2000).

Alguns estudos de modificação química demonstraram que a alquilação do resíduo His48 por brometo de p-bromofenacila (BPB) induz perda da atividade enzimática e toxicidade de PLA₂s de peçonhas de serpentes (SOARES; GIGLIO, 2003; SOARES et al., 2000; 2001; 2004b; SANTOS-FILHO et al., 2008).

A atividade enzimática de BmooTX-I foi testada após o tratamento com BPB, sendo que esta modificação química inibiu completamente a atividade hemolítica indireta das toxinas (dados não mostrados). Para observar a relação entre a atividade enzimática (hidrólise de lipídios fluorescentes) e o efeito farmacológico (inibição da agregação plaquetária), BmooTX-I foi previamente tratada com BPB.

Como mostrado nas Figuras 9D e 10B, ambos os efeitos foram reduzidos quando BmooTX-I foi incubado por 5 h na presença de BPB. Já, quando a enzima foi incubada por 24 h com este inibidor, tanto a atividade catalítica quanto a atividade anti-agregante foram inibidas, mostrando assim uma provável dependência entre estas atividades. O DMSO foi usado como o diluente na preparação da solução de BPB, sendo então avaliado seu possível efeito sobre a atividade enzimática da enzima. A BmooTX-I nativa ou tratada com DMSO foi capaz de hidrolisar NBD-PC (Fig. 9D), mostrando que esse diluente não tem ação sobre a enzima.

A atividade mitotóxica da BmooTX-I foi parcialmente inibida após alquilação de seu resíduo de His48 pelo BPB. Marchi-Salvador e colaboradores (2006) sugerem que o BPB se liga covalentemente ao sítio catalítico de PLA₂s (His48), alterando sua estrutura quaternária. Esta mudança pode resultar em um rearranjo de alguns resíduos presentes na região C-terminal da proteína (Lys122, por exemplo), o que afetaria os mecanismos de indução de toxicidade desta classe de enzimas.

Soares e Giglio (2003) sugerem várias hipóteses pelas quais a atividade mitotóxica é inibida pelo BPB. A primeira suposição seria uma alteração na conformação da proteína, concordando com dados citados no parágrafo anterior. Outra sugestão seria a de que em Asp49 PLA₂s, os efeitos tóxicos podem estar associados à atividade catalítica. Esta é uma hipótese interessante, mas não explica o fato de que várias PLA₂s ácidas, altamente catalíticas, não apresentam atividade mitotóxica. Outra proposta seria a contaminação da amostra, hipótese descartada neste trabalho, devido ao alto grau de pureza da BmooTX-I.

Respostas mediadas por aceptores podem explicar muitos dos efeitos observados para PLA₂s, no entanto, outros mecanismos de interação PLA₂/membrana podem também contribuir para a toxicidade destas proteínas. Por exemplo, o papel da estrutura quaternária é destacado pelo alto nível de toxicidade dos heterodímeros da crotoxina, em comparação a cada subunidade separada (HABERMANN; BREITHAUPT, 1978; FAURE et al., 1993). Além disso, é importante salientar que dois diferentes tipos de interações dimérica (ARNI et al., 1995) e trimérica (FREMONT et al., 1993) foram observados para cristais de svPLA₂s (ARNI; WARD, 1996; WARD et al., 1998).

Embora o efeito da estrutura quaternária sobre a catálise e sobre as atividades biológicas permanece incerto, um mecanismo envolvendo uma mudança estrutural quaternária em homodímeros de PLA₂ símile Lys49 tem sido proposto para explicar o aumento da permeabilidade das membranas artificiais após o tratamento com a proteína, e este mecanismo é independente de ambas as atividades catalíticas e aceptores ligantes (DA SILVA GIOTTO et al., 1998).

Poucos estudos já foram publicados com PLA₂s ácidas de peçonhas de serpentes brasileiras (FULY et al., 1997; 2000; SERRANO et al., 1999; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; KETELHUT et al., 2003; ROBERTO et al., 2004a, b ; MAGRO et al., 2003; 2005; COGO et al., 2006; MODESTO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007). A aquisição de informações adicionais irá contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos de ação destas enzimas individualmente e da sua participação em envenenamentos ofídicos.

Estudos funcionais e estruturais sobre estas enzimas ainda são necessários, a fim de elucidar os mecanismos de ação de PLA₂s ácidas isoladas de peçonhas serpente, uma vez que a sua atividade enzimática não parece ser o fator determinante da toxicidade. A caracterização bioquímica de PLA₂s ácidas presentes em peçonhas pode também resultar na compreensão da relação estrutura-função destas enzimas.

Concluindo, a BmooTX-I é uma enzima ácida isolada da peçonha de *B. moojeni*, pertencente ao subgrupo Asp49 das PLA₂s, as quais fazem parte do grupo IIA. Esta enzima apresenta alta atividade enzimática, induz edema de pata em camundongos, inibi a agregação plaquetária, induz a liberação de prostaglandina I₂, apresenta atividade citotóxica sobre bactérias, fungos e células tumorais, além de apresentar uma miotoxicidade não usual.

6. REFERÊNCIAS*

- ADAMICH, M.; DENNIS, E.A. Specificity reversal in phospholipase A₂ hydrolysis of lipid mixtures. **Biochem Biophys Res Commun.**; v.80; p.424-428; 1978.
- ALVARADO, J.; GUTIÉRREZ, J.M. Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae). **Rev biol trop.**; v.36; p.563-565; 1988.
- AMININASAB, M.; ELMI, M.M.; ENDLICH, N.; ENDLICH, K.; PAREKH, N.; NADERI-MANESH, H.; SCHALLER, J.; MOSTAFAVI, H.; SATTLER, M.; SARBOLOUKI, M.N.; MUHLE-GOLL, C. Functional and structural characterization of a novel member of the natriuretic family of peptides from the venom of *Pseudocerastes persicus*. **FEBS Lett.**; v.557; p.104-108; 2004.
- ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**; v.38; p.775-791; 2000.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.; FULY, A.L.; CORREA, F.M.; ROSA, J.C.; GREENE, L.J.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochem Pharmacol.**; v.64; p.723-732; 2002.
- ARNI, R.K.; WARD, R.J.; CINTRA, A.C.; GIGLIO, J.R. Crystallization and preliminary diffraction data of bothropstoxin I isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**; v.33; p.383-386; 1995. Review.
- ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A₂ - A structural review. **Toxicon**, v.34; p.827-841; 1996.

* de acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e Documentação: referências: elaboração: Rio de Janeiro, 2002.

- BALSINDE, J.; BALBOA, M.A.; YEDGAR, S.; DENNIS, E.A. Group V phospholipase A₂-mediated oleic acid mobilization in lipopolysaccharide-stimulated P388D(1) macrophages. **J Biol Chem.**; v.275; p.4783-4786; 2000.
- BARRAVIEIRA, B. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*, *Lachesis* e *Micrurus*. **Arq Bras Med.**; v.65; p.345-355; 1991.
- BASAVARAJAPPA, B.S.; GOWDA, T.V. Comparative characterization of two toxic phospholipases A₂ from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. **Toxicon**; v.30; p.1227-1238; 1992.
- BERG, O.G.; GELB, M.H.; TSAI, M.D.; JAIN, M.K. Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A₂-paradigm. **Chem Rev.**; v.101; p.2613-2654; 2001.
- BOILARD, E.; BOURGOIN, S.G.; BERNATCHEZ, C.; SURETTE, M.E. Identification of an autoantigen on the surface of apoptotic human T cells as a new protein interacting with inflammatory group IIA phospholipase A₂. **Blood**; v.102; p.2901-2909; 2003.
- BOZZOLA, J.J.; RUSSELL, L.D. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers 2ed; pp.670; 1998.
- BUCKLAND, A.G.; WILTON, D.C. The antibacterial properties of secreted phospholipases A₂. **Biochim Biophys. Acta**; v.1488; p.71-82; 2000. Review.
- BUSSE, R.; HECKER, M.; FLEMING, I. Control of nitric oxide and prostacyclin synthesis in endothelial cells. **Arzneimittelforschung**; v.44; p.392-396; 1994
- CALGAROTTO, A.K.; DAMICO, D.C.; PONCE-SOTO, L.A.; BALDASSO, P.A.; DA SILVA, S.L.; SOUZA, G.H.; EBERLIN, M.N.; MARANGONI, S. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A₂ BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**; v.51; p.1509-1519; 2008.

- CALVETE, J.J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J Mass Spectrom.**; v.42; 1405-1414; 2007. Review.
- CHANG, C.C.; SU, M.J. Presynaptic toxicity of the histidine-modified, phospholipase A₂-inactive, beta-bungarotoxin, crotoxin and notexin. **Toxicon**; v.20; p.895-905; 1982.
- CHIOATO, L.; WARD, R. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon**; v.42; p.869-883; 2003.
- CHIOATO, L.; ARAGÃO, E.A.; LOPES-FERREIRA, T.; MEDEIROS, A.I.; FACCIOLI, L.H.; WARD, R.J. Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A₂ by scanning alanine mutagenesis. **Biochim Biophys. Acta**; v.1768; p.1247-57; 2007.
- COGO, J.C.; LILLA, S.; SOUZA, G.H.M.F.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. Purification; sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochimie**, v.88; p.1947-1959; 2006.
- CORDA, D.; IURISCI, C.; BERRIE, C.P. Biological activities and metabolism of the lysophosphoinositides and glycerophosphoinositols. **Biochim Biophys. Acta**; v.1582; p.52-69; 2002. Review.
- CORRÊA, L.C.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; CINTRA, A.C.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R. Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A₂ with low catalytic activity: Insights into Ca²⁺-independent catalytic mechanism. **Biochim Biophys. Acta**; v.1784; p.591-599; 2008.
- COSTA, T.R.; MENALDO, D.L.; OLIVEIRA, C.Z.; SANTOS-FILHO, N.A.; TEIXEIRA, S.S.; NOMIZO, A.; FULY, A.L.; MONTEIRO, M.C.; De SOUZA, B.M.; PALMA, M.S.; STÁBELI, R.G.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. Myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**; v.29; p.1645-1656; 2008.

- CUMMINGS, B.S.; MCHOWAT, J.G.; SCHNELLMAN, R.G. Phospholipase A₂s in cell injury and death. **J Pharmacol.**; v.294; p.793–799; 2000.
- DANIELE, J.J.; BIANCO, I.D.; FIDELIO, G.D. Kinetic and pharmacologic characterization of phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedii* venom. **Arch Biochem Biophys.**; v.318; p.65-70; 1995.
- DANIELE, J.J.; BIANCO, I.D.; DELGADO, C.; CARRILLO, D.B.; FIDELIO, G.D. A new phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedii* (Yarará chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**; v.35; p.1205-115; 1997.
- DA SILVA GIOTTO, M.T.; GARRATT, R.C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y.P.; GIGLIO, J.R.; CINTRA, A.C.; DE AZEVEDO, W.F.JR.; ARNI, R.K.; WARD, R.J. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. **Proteins**; v.30; p.442-454; 1998.
- DENNIS, E.A.; RHEE, S.G.; BILLAH, M.M.; HANNUN, Y.A. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. **FASEB J.**; v.5; p.2068-2077; 1991.
- DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipases A₂. **J. Biol. Chem.**; v.269; p.13057-13060; 1994.
- DENNIS, E.A. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. **Trends Biochem Sci.**; v.22; p.1-2; 1997. Review.
- Dennis, E.A. Phospholipase A₂ in eicosanoid generation. **Am J Respir Crit Care Med.**; v.161; p.32-35; 2000. Review.
- DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; ZAMUDIO, F.; GUTIÉRREZ, J.M. Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A₂ variant, from *Bothrops asper* snake venom. **Nat. Toxins**; v.3; p.26–31; 1995.
- DÍAZ-OREIRO, C.; GUTIÉRREZ, J.M. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper*

- and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. **Toxicon**; v.35; p.241-252; 1997.
- DIZ FILHO, E.B.; MARANGONI, S.; TOYAMA, D.O.; FAGUNDES, F.H.; OLIVEIRA, S.C.; FONSECA, F.V.; CALGAROTTO, A.K.; JOAZEIRO, P.P.; TOYAMA, M.H. Enzymatic and structural characterization of new PLA₂ isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**; v.53; p.104-114; 2008.
- DOS SANTOS, J.I.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; FERNANDES, C.A.; SILVEIRA, L.B.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R. Preliminary X-ray crystallographic studies of a Lys49-phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom complexed with *p*-bromo-phenacyl bromide and alpha-tocopherol inhibitors. **Protein Pept Lett.**; v.14; p.698-701; 2007.
- DOTY, P.; GEIDUSCHEC, E.P. In: **The proteins. I-A.** (Neurath, H.; Bailey. K. Eds), 1953.
- FAURE, G.; HARVEY, A.L.; THOMSON, E.; SALIOU, B.; RADVANYI, F.; BON, C. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. **Eur J Biochem.**; v.214; p.491-496; 1993.
- FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente Botrópico. In: **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes.** p.72-86, 2003.
- FRANÇA, S.C.; KASHIMA, S.; ROBERTO, P.G.; MARINS, M.; TICLI, F.K.; PEREIRA, J.O.; ASTOLFI-FILHO, S.; STÁBELI, R.G.; MAGRO, A.J.; FONTES, M.R.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* l-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. **Biochem Biophys Res Commun.**; v.355; p.302–306; 2007.

- FREMONT, D.H.; ANDERSON, D.H.; WILSON, I.A.; DENNIS, E.A.; XUONG, N.H. Crystal structure of phospholipase A₂ from Indian cobra reveals a trimeric association. **Proc Natl Acad Sci. USA**; v.90; p.342-346; 1993.
- FULY, A.L.; MACHADO, O.L.; ALVES, E.W.; CARLINI, C.R. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Thromb Haemost.**; v.78; p.1372-1380; 1997.
- FULY, A.L.; CALIL-ELIAS, S.; ZINGALI, R.B.; GUIMARÃES, J.A.; MELO, P.A. Myotoxic activity of an acidic phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Toxicon**; v.38; p.961-972; 2000.
- FULY, A.L.; DE MIRANDA, A.L.P.; ZINGALI, R.B.; GUIMARÃES, J.A. Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. **Biochem Pharmacol.**; v.63; p.1589-1597; 2002.
- FULY, A.L.; CALIL-ELIAS, S.; MARTINEZ, A.M.B.; MELO, P.A.; GUIMARÃES, J.A. Myotoxicity induced by an acidic Asp-49 phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* snake venom Comparison with lysophosphatidylcholine. **Int J Biochem Cell Biol.**; v.35; p.1470–1481; 2003.
- FULY, A.L.; SOARES, A.M.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J.R.; GUIMARÃES, J.A. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A₂ isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**; v.86; p.731-739; 2004.
- GEOGHEGAN, P.; ANGULO, Y.; CANGELOSI, A.; DÍAZ, M.; LOMONTE, B. Characterization of a basic phospholipase A₂ homologue myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops neuwiedii* (yará chica) from Argentina. **Toxicon**; v.37; p.1735–1746; 1999.
- DE GRAAF, D.C.; AERTS, M.; DANNEELS, E.; DEVREESE, B. Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. **J Proteom.**; v.72; p.145-154; 2009.

- GRÖNROOS, J.M.; NEVALAINEN, T.J. Increased concentrations of synovial-type phospholipase A₂ in serum and pulmonary and renal complications in acute pancreatitis. **Digestion**; v.52; p.232-236; 1992.
- GRÖNROOS, J.O.; LAINE, V.J.; NEVALAINEN, T.J. Bactericidal group IIA phospholipase A₂ in serum of patients with bacterial infections. **J Infect Dis.**; v.185; p.1767-1772; 2002.
- GRYGLEWSKI, R.J. Endothelial nitric oxide, prostacyclin (PGI₂) and tissue plasminogen activator (t-PA): alliance or neutrality. **Pol J Pharmacol.**; v.47; p.467-472; 1995.
- GUTIÉRREZ, J.M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. Alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**; v.26; p.411-413; 1988.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: **Kini, R.M.; (Ed.); Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure; Function and Mechanism**; Wiley; Chichester; pp.321-352; 1997.
- HABERMANN, E.; BREITHAUPT, H. The crotoxin complex--an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**; v.16; p.19-30; 1978. Mini-review.
- HAN, S.K.; YOON, E.T.; CHO, W. Bacterial expression and characterization of human secretory class V phospholipase A₂. **Biochem J.**; v.331; p.353-357; 1998.
- HAN, S.K.; KIM, K.P.; KODURI, R.; BITTOVA, L.; MUNOZ, N.M.; LEFF, A.R.; WILTON, D.C.; GELB, M.H.; CHO, W. Roles of Trp31 in high membrane binding and pró-inflammatory activity of human group V phospholipase A₂. **J Biol Chem.**; v.274; p.11881-11888; 1999.
- HANADA, K.; NISHIJIMA, M.; AKAMATSU, Y.; PAGANO, R.E. Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent insolubility of

- alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in mammalian membranes. **J Biol Chem.**; v.270; p.6254-6260; 1995.
- HANASAKI, K.; ARITA, H. Biological and pathological functions of phospholipase A₂ receptor. **Arch Biochem Biophys.**; v.372; p.215-223; 1999. Review.
- HARRIS, J.B.; GRUBB, B.D.; MALTIN, C.A.; DIXON, R. The neurotoxicity of the venom phospholipases A₂; notexin and taipoxin. **Exp Neurol.**; v.161; p.517-526; 2000.
- HIGASHINO, T.; MIURA, T.; MIURA, C.; YAMAUCHI, K. Histological studies on early oogenesis in barfin flounder (*Verasper moseri*). **Zoolog Sci.**; v.19; p.557-563; 2002.
- HIGUCHI, D.A.; BARBOSA, C.M.V.; BINCOLETTO, C.; CHAGAS, J.R.; MAGALHÃES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F.; PESQUERO, J.B.; ARAÚJO, R.C.; PESQUERO, J.L. Purification and partial characterization of two phospholipases A₂ from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**; v.89; p.1-10; 2006.
- ITZHAKI, R.F.; GILL, D.M. A microbiuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**; v.9; p.401-410; 1964.
- JIANG, W.; MA, T.; SU, X.; QIU, P.; YAN, G. Enzymatic activities and functional characterization of a novel recombinant snake venom proteinase from *Agkistrodon acutus*. **Biochimie**; v.91; p.277-287; 2009.
- JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiologia e Quadro Clínico do Acidente por Cascavel Sul-Americana (*C. durissus*). **Rev Inst Med Trop.**; v.34; p.347-354; 1992.
- JUÁREZ, P.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Snake venomomics: characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and MS/MS analysis. **Proteomics**; v.4; p.327-338; 2004.

- KETELHUT, D.F.J.; HOMEM DE MELO, M.; VERONESE, E.L.G.; ESMERALDINO, L.E.; MURAKAMI, M.T.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R.; CINTRA, A.C.O.; SAMPAIO, S.V. Isolation; characterization and biological activity of acidic phospholipase A₂ isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**; v.85; p.983-991; 2003.
- KINI, R.M. Phospholipase A₂: a complex multifunctional protein puzzle. in: **R. M. Kini (Ed), Venom Phospholipase A₂ enzymes: Structure, Function and Mechanism**, Wiley, Chichester, p.1-28, 1997.
- KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**; v.42; p.827-40; 2003. Review.
- KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. **Prostaglandins other lipid mediat.**; v.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.680-685; 1970.
- LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. **Trends Pharmacol Sci.**; v.20; p.162-70; 1999. Review.
- LANDUCCI, E.C.T.; CASTRO, R.C.; PEREIRA, M.F.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur. J Pharmacol.**; v.343; p.257-263; 1998.
- LANDUCCI, E.C.T.; CASTRO, R.C.; TOYAMA, M.; GIGLIO, J.R.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Inflammatory oedema induced by the Lys-49 phospholipase A₂ homologue piratoxin-I in the rat and rabbit. Effect of polyanions and p-bromophenacyl. **Biochem Pharmacol.**; v.59; p.1289-1294; 2000.
- LEFKOWITZ, L.J.; DEEMS, R.A.; DENNIS, E.A. Expression of group IA phospholipase A₂ in *Pichia pastoris*: identification of a phosphatidylcholine

- activator site using site-directed mutagenesis. **Biochemistry**; v.38; p.14174-14184; 1999.
- LI, Y.; YU, B.Z.; ZHU, H.; JAIN, M.K.; TSAI, M.O. Phospholipase A₂ engineering. Structural and functional roles of the highly conserved active site residue aspartate-49. **Biochemistry**; v.33; p.14714-14722; 1994.
- LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**; v.42; p.963-977; 2003. Review.
- MAGRO, A.J.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6; two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem Biophys Res Commun.**; v.311; p.713-720; 2003.
- MAGRO, A.J.; TAKEDA, A.A.S.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Structure of BthA-I complexed with *p*-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activity. **Acta Crystallogr. D**; v.61; p.1670-1677; 2005.
- MARCHI-SALVADOR, D.P.; FERNANDES, C.A.H.; AMUI, S.F.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a myotoxic Lys49-PLA₂ from *Bothrops jararacussu* venom complexed with *p*-bromophenacyl bromide. **Acta Crystallogr. F**; v.62; p.600-603; 2006.
- MARCHI-SALVADOR, D.P.; CORRÊA, L.C.; MAGRO, A.J.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A₂ formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Proteins**; v.72; p.883-891; 2008.
- MEBS, D. Scorpions and snakes, such as cobras, mambas and vipers made the African continent famous for venomous animals. **Bull Soc Pathol Exot.**; v.95, p.131, 2002.

- MINISTÉRIO da SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 6ed.; pp.320; 2005.
- MODESTO, J.C.A.; SPENCER, P.J.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R.C.; OLIVA, M.L.; DA SILVA, M.B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; GUARNIERI, M.C. BE-I-PLA₂; a novel acidic phospholipase A₂ from *Bothrops erythromelas* venom: isolation; cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I₂ release by endothelial cells. **Biochem Pharmacol.**; v.72; p.377-384; 2006.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J immun met.**; v.65; p.55-63; 1983.
- MURAKAMI, M.; TADA, K.; SHIMBARA, S.; KAMBE, T.; SAWADA, H.; KUDO, I. Detection of secretory phospholipase A₂s related but not identical to type IIA isozyme in cultured mast cells. **FEBS Lett.**; v.413; p.249-254; 1997.
- MURAKAMI, M.; KUDO, I. Diversity and regulatory functions of mammalian secretory phospholipase A₂s. **Adv Immunol.**; v.77; p.163-194; 2001. Review.
- NEVALAINEN, T.J. Serum phospholipases A₂ in inflammatory diseases. **Clin Chem.**; v.39; p.2453-2459; 1993. Review.
- NEVALAINEN, T.J.; GRAHAM, G.G.; SCOTT, K.F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂. **Biochim Biophys Acta.**; v.81; p.1-9; 2008. Review.
- NISENBOM, H.E.; SEKI, C.; VIDAL, J.C. Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon**; v.24; p.259-272; 1986.
- OLIVEIRA, C.F.; LOPES, D.S.; MENDES, M.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; HAMAGUCHI, A.; ALCÂNTARA, T.M.; CLISSA, P.B.; RODRIGUES,

- V.M. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedii) pauloensis* snake venom. **Toxicon**; v.53; 560-569; 2009.
- OUYANG, C.; TENG, C.M.; HUANG, T.F. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**; v.30; p.945-966; 1992. Review.
- OWNBY, C.L.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**; v.37; p.411-445; 1999.
- PANINI, S.R.; YANG, L.; RUSINOL, A.E.; SINENSKY, M.S.; BONVENTRE, J.V.; LESLIE, C.C. Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/ oxysterol. **J Lipid Res.**; v.42; p.1678–1686; 2001.
- PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J.A.; GORVEL, J.P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ 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.
- PETERS-GOLDEN, M. Molecular mechanisms of leukotriene synthesis: the changing paradigm. **Clin Exp Allergy.**; v.28; p.1059-1065; 1998.
- PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Rev Ass Med Bras.**; v.47; p.24-29; 2001.
- PONCE-SOTO, L.A.; TOYAMA, M.H.; HYSLOP, S.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **J Protein Chem.**; v.21; p.131-136; 2002.
- RAMIREZ, F.; JAIN, M.K. Phospholipase A₂ at the bilayer interface. **Proteins**; v.9; p.229-39; 1991.

- RIBARDO, D.A.; CROWE, S.E.; KUHL, K.R.; PETERSON, J.W.; CHOPRA, A.K. Prostaglandin levels in stimulated macrophages are controlled by phospholipase A₂-activating protein and by activation of phospholipase C and D. **J Biol Chem.**; v.276; p.5467-5475; 2001.
- ROBERTO, P.G.; KASHIMA, S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, J.O.; ASTOLFI-FILHO, S.; NOMIZO, A.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.; SOARES, A.M.; FRANÇA, S.C. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom. **Prot J.**; v.4; p.273-285; 2004a.
- ROBERTO, P.G.; KASHIMA, S.; SOARES, A.M.; CHIOATO, L.; FACA, V.M.; FULY, A.L.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J.O.; FRANCA, S.C. Cloning and expression of an acidic platelet aggregation inhibitor phospholipase A₂ cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland. **Protein Expr Puri.**; v.37; p.102-108; 2004b.
- RODRIGUES, R.S.; IZIDORO, L.F.M.; TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; FULY, A.L.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**; v.50; p.153-65; 2007.
- RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; ANDRIO-ESCARSO, S.H.; FRANCESCHI, A.M.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Pathological alterations induced by neuwiedase; a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie**; v.83; p.471-479; 2001.
- RODRIGUES, V.M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R.S.; ARAÚJO, A.L.; MALTA-NETO, N.R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E.A.V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**; v.44; p.305-314; 2004.

- ROSENBERG, D. The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons; in: J.B. Harris (Ed.); **Natural Toxins Animal; Plant and Microbial**; Oxford Science Publications; Oxford; pp.129–174; 1986.
- SÁ, J.M.; CHIOATO, L.; FERREIRA, T.L.; DE OLIVEIRA, A.H.; RULLER, R.; ROSA, J.C.; GREENE, L.J.; WARD, R.J. Topology of the substrate-binding site of a Lys49-phospholipase A₂ influences Ca²⁺-independent membrane-damaging activity. **Biochem J.**; v.382; p.191-198; 2004.
- SANT'ANA, C.D.; MENALDO, D.L.; COSTA, T.R.; GODOY, H.; MULLER, V.D.M.; AQUINO, V.H.; ALBUQUERQUE, S.; SAMPAIO, S.V.; MONTEIRO, M.C.; STÁBELI, R.G.; SOARES, A.M. Antiviral and antiparasite properties of an l-amino acid oxidase from the Snake *Bothrops jararaca*: Cloning and identification of a complete cDNA sequence. **Biochem Pharmacol.**; v.76; p.279-288; 2008.
- SANTOS-FILHO, N.A.; SILVEIRA, L.B.; OLIVEIRA, C.Z.; BERNARDES, C.P.; MENALDO, D.L.; FULY, A.L.; ARANTES, E.C.; SAMPAIO, S.V.; MAMEDE, C.C.; BELETTI, M.E.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A.M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**; v.52; p.908-917; 2008.
- SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys. Acta**; v.1761; p.1246-1259; 2006.
- SCOTT, D.L.; SIGLER, P.B. The structural and functional roles of calcium ion in secretory phospholipases A₂. **Adv Inorg Biochem.**; v.10; p.139-155; 1994.
- SCOTT, D.L.; WHITE, S.P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M.H.; SIGLER, P.B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. **Science**; v.250; p.1541-1546; 1990.
- SERRANO, S.M.; REICHL, A.P.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E.A.; SANTORO, M.L.; SAMPAIO, C.A.; CAMARGO, A.C.; ASSAKURA, M.T. A novel phospholipase A₂; BJ-PLA₂; from the venom of the snake *Bothrops*

- jararaca*: purification; primary structure analysis; and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. **Arch Biochem Biophys.**; v.367; p.26-32; 1999.
- SINGH, S.B.; ARMUGAM, A.; KINI, R.M.; KANDIAH, J. Phospholipase A₂ with platelet aggregation inhibitor activity from *Austrelaps superbis* venom: protein purification and cDNA cloning. **Arch Biochem Biophys.**; v.375; p.289-303; 2000.
- SIX, D.A.; DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochim Biophys. Acta**; v.1488; p.1-19; 2000.
- SNITKO, Y.; HAN, S.K.; LEE, B.I.; CHO, W. Differential interfacial and substrate binding modes of mammalian pancreatic phospholipases A₂: a comparison among human, bovine, and porcine enzymes. **Biochemistry**; v.38; p.7803-7810; 1999.
- 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.503-514; 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 a myotoxin I from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Arch Biochem Biophys.**; v.373; p.7-15; 2000a.
- SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, V.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R. Molecular cloning and functional characterization of BnSP-7, a myotoxin Lys-49 phospholipase A₂ homologue, from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch Biochem Biophys.**; v.378, p.201-209; 2000b.

- SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; BORTOLETO, R.K.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; ARNI, R.K.; WARD, R.J.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A_2 from *Bothrops pirajai* snake venom. **Arch Biochem Biophys.**; v.387; p.188-196; 2001.
- SOARES, A.M.; OSHIMA-FRANCO, Y.; VIERA, C.A.; LEITE, G.B.; FLETCHER, J.E.; JIANG, M.S.; CINTRA, A.C.; GIGLIO, J.R.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Mn^{2+} ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I; a myotoxic Lys49 phospholipase A_2 homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Int J Biochem Cell Biol.**; v.34; p. 668–677; 2002.
- 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.855-868; 2003. Review.
- SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R. Phospholipases A_2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Curr Org Chem.**; v.8; p.1677-1690; 2004a. Review.
- SOARES, A.M.; SESTITO, W.P.; MARCUSSI, S.; STÁBLEI, R.G.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; CUNHA, O.A.B.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R. Alkylation of myotoxic phospholipases A_2 in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **Int J Biochem Cell Biol.**; v.36; p.258–270; 2004b.
- SRIBAR, J.; COPIC, A.; PARIS, A.; SHERMAN, N.E.; GUBENSEK, F.; FOX, J.W.; KRIZAJ, I. A high affinity acceptor for phospholipase A_2 with neurotoxic activity is a calmodulin. **J Biol Chem.**; v.276; p.12493-12496; 2001.
- STÁBELI, R.G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; PIETRO, R.C.L.R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; SOARES, AM. Platelet aggregation and antibacterial effects of an l-amino acid oxidase purified

- from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg Med Chem.**; v.12; p.2881-2886; 2004.
- STÁBELI, R.G.; AMUI, S.F.; SANT'ANA, C.D.; PIRES, M.G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M.C.; ROMÃO, P.R.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.; SOARES, A.M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comp Biochem Physiol.**; v.142C; p.371-381; 2006.
- STÁBELI, R.G.; SANT'ANA, C.D.; RIBEIRO, P.H.; COSTA, T.R.; TICLI, F.K.; PIRES, M.G.; SOARES, A.M. Cytotoxic l-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization, **Int J Biol Macromol.**; v.41; p.132-140; 2007.
- STILES, B.G.; SEXTON, F.W.; WEINSTEIN, S.A. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**; v.29; p.1129-1141; 1991.
- TEMPONE, A.G.; ANDRADE, Jr.H.F.; SPENCER, P.J.; LOURENÇO, C.O.; ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its l-amino acid oxidase. **Biochem Biophys Res Commun.**; v.280; p.620-624; 2001.
- TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. **Pesq Vet Bras.** [online]. v.26,p.55-68; 2006.
- TORRES, A.M.; WONG, H.Y.; DESAI, M.; MOOCHHALA, S.; KUCHEL, P.W.; KINI, R.M. Identification of a novel family of proteins in snake venoms. Purification and structural characterization of nawaprin from *Naja nigricollis* snake venom. **J Biol Chem.**; v.278; p.40097-40104; 2003.
- TOYAMA, M.H.; SOARES, A.M.; WEN-HWA, L.; POLIKARPOV, I.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-II; a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Biochimie**; v.82; p.245-50; 2000.

- TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D.O.; PASSERO, L.F.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.; TOMOKANE, T.Y. Isolation of a new l-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom, **Toxicon**; v.47; p.47-57; 2006.
- TU, A.T.; BAKER, B.; WONGVIBULSIN, S.; WILLIS, T. Biochemical characterization of atroxase and nucleotide sequence encoding the fibrinolytic enzyme. **Toxicon**; v.34; p.1295-300; 1996.
- VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂?. **Biochimie**; v.82; p.815-831; 2000. Review.
- VARANDA, E.A.; GIANNINI, M.J.S. Bioquímica de venenos de serpentes. In: **venenos. Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. p.205-223; 1999.
- VERHEIJ, H.M.; VOLWERK, J.J.; JANSEN, E.H.; PUYK, W.C.; DIJKSTRA, B.W.; DRENTH, J.; DE HAAS, G.H. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry**; v.19; p.743-750; 1980.
- VESTERBERG, O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. **Biochim Biophys. Acta**; v.257; p.11-9; 1972.
- YU, B.Z.; POI, M.J.; RAMAGOPAL, U.A.; JAIN, R.; RAMAKUMAR, S.; BERG, O.G.; TSAI, M.D.; SEKAR, K.; JAIN, M.K. Structural basis of the anionic interface preference and kcat* activation of pancreatic phospholipase A₂ **Biochemistry**; v.39; p.12312-12323; 2000.
- WARD, R.J.; DE AZEVEDO, W.F.JR.; ARNI, R.K. At the interface: crystal structures of phospholipases A₂. **Toxicon**; v.36; p.1623-1633; 1998.
- WISNER, A.; LEDUC, M.; BON, C. C-type lectins from snake venoms: new tools for research in thrombosis and haemostasis. In: **Perspectives In Molecular Toxinology**, Ménez, A. (ed.) Wiley, Chichester , UK; p.357-375; 2002.

WITTCOFF, H. **The phosphatides**. Ed. Reinhold Publising Corporation (New York), p.99-115; 1951.

ZHANG, Y.I.; WANG, J.H.; LEE, W.H.; WANG, Q.; LIU, H.; ZHENG, Y.T. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom l-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. **Biochem Biophys Res Commun.**; v.309; p.598–604; 2003.