Universidade de São Paulo

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização funcional e estrutural de fosfolipases A₂ isoladas da
peçonha da serpente *Bothrops asper* do Panamá**

Aristides Quintero Rueda

**Ribeirão Preto
2009**

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**“Caracterização funcional e estrutural de fosfolipases A₂ isoladas
da peçonha da serpente *Bothrops asper* do Panamá**

Aristides Quintero Rueda

**Ribeirão Preto
2009**

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

“Caracterização funcional e estrutural de fosfolipases A₂ isoladas da peçonha da serpente *Bothrops asper* do Panamá”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Toxicologia.

Área de concentração: Toxicologia

Orientado: Aristides Quintero Rueda

Orientador: Prof. Dr. Andreimar M. Soares

Ribeirão Preto

2009

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Rueda, Aristides Quintero

“Caracterização funcional e estrutural de fosfolipases A₂ isoladas da peçonha da serpente *Bothrops asper* do Panamá”

Ribeirão Preto, 2009.

113 p. :il. : 30 cm

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

Orientador: Soares, Andreimar Martins

1. *Bothrops asper*. 2. Panamá. 3. Peçonha de serpentes. 4. Fosfolipases A₂. 5. Efeito miotóxico. 6. Inibição da agregação plaquetária. 7. Inflamação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aristides Quintero Rueda

“Caracterização funcional e estrutural de fosfolipases A₂ isoladas da peçonha da serpente

Bothrops asper do Panamá”

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Andreimar M. Soares

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, pelo carinho,
dedicação, atenção e amor, muito obrigado.

Aos meus irmãos pela confiança,
crédito e apoio constante.

In Memória de meus Avós
Que sempre estão presentes em
minhas lembranças.

A meus Professores

Aos meus amigos e amigas

In Memória
As vítimas de *Bothrops asper*
do Panamá

"Assume formas com que, e em que, se nega, porque, como passa sem rastro reto,
pode deixar o que foi, visto que verdadeiramente o não foi. "

- Fernando Pessoa, *O Caminho da Serpente*

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem ele nada é possível, sem ele nada sou.

A Matsumae International Foundation, OEA/Fullbright, IFARHU-SENACYT e CSS pelo apoio financeiro nas diversas etapas deste trabalho.

À Universidade Autônoma de Chiriquí, pelo tempo para desenvolver este trabalho.

À Universidade de São Paulo, em especial a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP-FCFRP) por abrir suas portas para minha formação acadêmica e de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Andreimar M. Soares, meu orientador, pela oportunidade e confiança, ainda nos momentos mais difíceis desta jornada.

Ao Prof. José R. Giglio da FMRP-USP, por seus acertados comentários e sugestões.

Aos professores colaboradores Profa. Dra. Eliane C. Arantes, FCFRP-USP; Prof. Dr. Auro Nomizo, FCFRP-USP; Profa. Dra. Marta C. Monteiro, UFPA; Profa. Dra. Juliana Zuliani, UNIR; Prof. Dr. Rodrigo G. Stábeli, UNIR; Prof. Dr. André L. Fuly, UERJ, Profa. Dra. Veridiana M. Rodrigues, UFU; Prof. Dr. Masugi Marujama, Universidade de Miyasaki, Japão; Profa. Dra. Ida Sano Martins do Instituto Butantan, Prof. Dr. Wilson Fernandes do serpentário do Instituto Butantan, Profa. Dra. Nora Ortiz de Moreno, UP, que contribuíram de forma essencial para a conclusão deste trabalho.

À Biol. Isela González, MEDUCA, pela colaboração na captura das serpentes.

À Profa. Cleuza Simões e a Doutoranda Mariana Simões, pelas sugestões e recomendações na redação, apresentação e revisão deste trabalho.

A todas as outras pessoas que de distintas maneiras contribuíram desinteressadamente com este trabalho, ainda que fosse extenso citar todas elas, recebam de mim um fraternal abraço. Muito obrigado.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas e siglas	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 As serpentes.....	2
1.2 Peçonhas de serpentes.....	10
1.3 Fosfolipases A ₂	13
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Peçonha	29
3.2 Animais.....	30
3.3 Reagentes e equipamentos.....	30
3.4 Métodos.....	32
3.4.1 Isolamento de PLA ₂ s.....	32
3.4.1.1 Preparação da amostra	32
3.4.1.2 Cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose	32
3.4.1.3 Cromatografia de interação hidrofóbica em Fenil Sepharose	32
3.5 Sistemas de ultrafiltração	33
3.6 Caracterizações Bioquímicas	33
3.6.1 Determinação quantitativa de proteínas.....	33
3.6.2 Determinação do Peso Molecular (SDS-PAGE a 12%)	33
3.6.3 Focalização Isoelétrica.....	34
3.6.4 Determinação do peso molecular por Espectrometria de massa.....	34
3.6.5 Sequenciamento N-terminal	35
3.7 Caracterizações enzimáticas.....	37
3.7.1 Atividade hemolítica indireta.....	37
3.7.2 Atividade Fosfolipásica.....	37
3.7.3 Atividade Fosfolipásica sobre lipídeos fluorescentes	38
3.7.4 Atividade Proteolítica sobre a fibrina	39
3.8 Caracterizações Toxicológicas.....	39
3.8.1 Atividade Miotóxica	39
3.8.2 Análises Histopatológicas em Microscopia Óptica	40
3.8.3 Indução de edema em camundongos	40
3.8.4 Atividade hemorrágica.....	41
3.8.5 Letalidade.....	41
3.8.6 Atividade Coagulante	41
3.9 Caracterizações Farmacológicas	42

3.9.1 Atividade antitumoral	42
3.9.2 Atividade citotóxica.....	43
3.9.2.1 Atividade bactericida	43
3.9.2.2 Atividade fungicida	43
3.9.2.3 Atividade citotóxica em células J774A. 1.....	43
3.9.2.4 Avaliação do metabolismo oxidativo de células J774A. 1	44
3.9.2.5 Atividade fagocítica de células J774A.1 do zimosan não opsonizado	45
3.9.2.6 Efeitos em plaquetas.....	45
3.10 Análises dos resultados.....	46
4. RESULTADOS.....	47
4.1 Caracterizações Bioquímicas e Toxicológicas da peçonha.....	47
4.2 Isolamento e Caracterização Bioquímica	55
4.3 Caracterizações Enzimáticas, Toxicológicas e Farmacológicas	61
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÕES	86
7. REFERÊNCIAS.....	88

RESUMO

Quintero, A. **Caracterização funcional e estrutural de fosfolipases A₂ isoladas da peçonha de *Bothrops asper* do Panamá.** 2009. 113 f. Tese (Doutoral), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009.

Os envenenamentos causados pelas serpentes do gênero *Bothrops* são os mais importantes do ponto de vista médico e econômico na América Central. Dentre estas, a serpente *Bothrops asper* é responsável por 90% dos envenenamentos ofídicos registrados no Panamá anualmente. Apesar da relevância médica e econômica, só a peçonha de populações de *B. asper* da Costa Rica e Guatemala tem sido estudadas em detalhes. Neste trabalho apresentamos a caracterização da peçonha da *B. asper* do Panamá e o isolamento, a caracterização funcional e estrutural de quatro fosfolipases A₂ básicas denominadas MTX-I, MXT-II, MTX-III e MXT-IV e de uma fosfolipase A₂ ácida denominada Basp-I-PLA₂. As fosfolipases A₂ foram isoladas da peçonha em duas etapas usando cromatografia de troca iônica em CM-Sephadex (0,05 M NH₄HCO₃ pH 8,1), e cromatografia hidrofóbica em Fenil-Sephadex (0,05 M Tris-HCl pH 7,4) seguida de gradiente de concentração de 4 a 0 M NaCl no mesmo tampão a temperatura ambiente (a 25°±3°C). A isoforma ácida demonstrou maior atividade catalítica que as isoformas básicas, quando atuou sobre fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol. A focalização isoelétrica evidencia pIs de 8,1 a 8,3 para as MTXs e 4,6 para isoforma Basp-I-PLA₂. A determinação da massa molecular por espectrometria de massa mostrou que MTX-1 14, 156.5; MTX-2 14.249,5 e MTX-3 14.253,0 e Basp-I-PLA₂ 14, 246.0.8 Da. As PLA₂s (MTX-I, II, III e IV) induziram atividade miotóxica, reação inflamatória com migração de leucócitos ao músculo e ativação de macrófagos para exercer fagocitose e produção de superóxido. MTX-II exerceu um forte efeito citotóxico contra células tumorais JURKAT, *C. albicans* e *E. coli*. A fosfolipase A₂ ácida, testada no plasma enriquecido com plaquetas, mostrou potente efeito inibitório na agregação plaquetária induzida pela ADP e colágeno. A análise de sequência N-terminal demonstrou que as proteínas MTX-I, MTX-III e Basp-I-PLA₂ pertencem à subclasse de fosfolipases A₂ Asp49 cataliticamente ativas, enquanto que, MTX-II e MTX-IV pertencem à subclasse de fosfolipases A₂ Lys49-homólogas cataliticamente inativas. Além disso, a sequência N-terminal das fosfolipases A₂ básicas isoladas, demonstrou claramente que as miotoxinas isoladas neste trabalho são similares às miotoxinas previamente isoladas da peçonha da *B. asper* da Costa Rica. A Basp-I-PLA₂ é uma nova fosfolipase A₂ ácida isolada da peçonha de *B. asper* do Panamá e sua sequência N-terminal revelou uma alta homologia com outras PLA₂s ácidas Asp49 isoladas de peçonhas de serpentes.

Palavras chaves: *Bothrops asper*, Panamá, caracterização da peçonha de serpente, fosfolipases A₂, miotoxicidade, inibição da agregação plaquetária, inflamação.

ABSTRACT

Quintero, A. **Functional and structural characterization of phospholipases A₂ isolated of *Bothrops asper* snake venom from Panamá.** 2009. 113 p. Thesis (Doctoral), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009.

Envenoming by *Bothrops* snakes is the most serious kind of envenoming from the medical and economical point of view in Central America. *Bothrops asper* snake is responsible for 90% of the snakebites registered in Panama every year. Despite its medical and economical relevance, only the venom of Costa Rican and Guatemala populations of this species has been studied to some detail, and there is very little information on intraspecies variability in venom composition and toxicity. In this study the crude venom of *B. asper* from Panama was characterized and its pharmacological and biochemistry activities were investigated with standard laboratory assays. Furthermore, we describe the isolation, functional and structural characterization of four basic phospholipases A₂, named MTX-I, MTX-II, MTX-III, MTX-IV and a new acid phospholipase A₂ named Basp-I-PLA₂. The proteins were isolated from the crude venom by a combination of two chromatographic steps, using ion-exchange chromatography on CM-Sepharose (0.05 M NH₄HCO₃ pH 8.1 buffer), and hydrophobic chromatography on Phenyl-Sepharose (0.05 M Tris-HCl pH 7.4), followed by concentration gradient from 4 to 0 M NaCl at 25°C in the same buffer. Analyses of phospholipids hydrolyzed by these enzymes have shown that all phospholipases belong to type A₂. The acidic isoform demonstrated more catalytic activity than the basic PLA₂s. This enzyme was more active on substrates as phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol. The isoelectric focusing evidenced pIs between 8.1 to 8.3 for the MTXs and 4.6 for the isoform Basp-I-PLA₂. Its mol. Wt was estimated by Mass spectrometry to be MTX-1 14,156.5; MTX-2 14,249.5 and MTX-3 14,253.0 and Basp-I-PLA₂ 14,246.0.8 Da. The PLA₂s (MTX-I, II, III and IV) induced myotoxic activity, inflammatory reaction mainly leukocyte migration to the muscle and activation of macrophages to exert phagocytic activity and production of superoxide. MTX-II, the most abundant one showed to be cytotoxic against JURKAT tumor cell line, *C. albicans* and *E. coli*. The acidic phospholipases A₂ when tested in platelet rich plasma, showed a potent inhibitory effect on aggregation induced by ADP and collagen. The analysis of the sequence N-terminal demonstrated that the MTX-I, MTX-III and BASP-I-PLA₂ belong to the subclass of Asp49 phospholipases A₂ catalytically active, whereas, MTX-II and MTX-IV belong to proteins of the subclass of the enzymatically inactive Lys49 PLA₂s-like. In addition, a sequence of the region N-terminal of the PLA₂s basic isolated, demonstrated clearly, that the isolated myotoxins in this work are similar of the previously isolated myotoxins of the snake venom *Bothrops asper* from Costa Rica. The Basp-I-PLA₂ is a new acidic PLA₂ and its sequence N-terminal revealed a high homology with other Asp49 acidic PLA₂s from snake venoms.

Key words: *Bothrops asper*, Panama, snake venom characterization, phospholipases A₂, myotoxicity, inhibition of platelet aggregation, inflammation.

RESUMEN

Quintero, A. **Caracterización funcional y estructural de fosfolipasas A₂ aisladas del veneno de *Bothrops asper* de Panamá.** 2009. 113 p. Tesis (Doctoral), Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, 2009.

Los envenenamientos causados por las serpientes del género *Bothrops* son los más importantes desde el punto de vista médico y económico en la América Central. De ellas, la serpiente *Bothrops asper* es responsable de 90% de los envenenamientos por mordeduras de serpientes registradas en Panamá cada año. A pesar de la relevancia médica y económica, sólo el veneno de poblaciones de *B. asper* de Costa Rica y Guatemala han sido estudiadas con algunos detalles y es poca la información que se tiene de la variabilidad intraespecies en la composición del veneno y su toxicidad. En este trabajo presentamos la caracterización del veneno de *B. asper* de Panamá y sus actividades farmacológicas y bioquímicas básicas determinadas con pruebas estandarizadas de laboratorio. Además de eso, describimos el aislamiento, caracterización funcional y estructural de cuatro fosfolipasas A₂ básicas denominadas MTX-I, MXT-II, MTX-III e MXT-IV y de una fosfolipasa A₂ ácida denominada Basp-I-PLA₂. Las proteínas fueron aisladas del veneno en dos etapas usando cromatografía de intercambio iónico en CM-Sepharose (amortiguador NH₄HCO₃ 0,05 M, pH 8,1) y cromatografía hidrofóbica en Fenil-Sepharose (0,05 M Tris-HCl pH 7,4) seguida de un gradiente de concentración de 4 a 0 M NaCl en el mismo amortiguador a 25°C. La isoforma ácida demostró una actividad catalítica mayor, que las isoformas básicas, cuando actuó sobre fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol. El enfoque isoeléctrico evidencia pls de 8.1 a 8.3 para las MTXs y 4,6 para la isoforma Basp-I-PLA₂. La determinación de la masa molecular por espectrometría de masa mostro que MTX-I 14.156,5; MTX-II 14.249,5 y MTX-III 14.253,0 y Basp-I-PLA₂ 14.246,0 Da. Las PLA₂s (MTX-I, II, III and IV) indujeron actividad miotóxica, reacción inflamatoria mediante migración de leucocitos al músculo y activación de macrófagos para ejercer fagocitosis y producción de superóxido. MTX-II, mostró un fuerte efecto citotóxico contra células tumorales JURKAT, *C. albicans* y *E. coli*. La fosfolipasa A₂ ácida, en plasma rico en plaquetas, mostró un potente efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria inducida por ADP y colágeno. El análisis de la secuencia N-terminal demostró que las proteínas MTX-I, MTX-III y Basp-I-PLA₂ pertenecen a la subclase de fosfolipasas A₂ Asp49 catalíticamente activas, mientras que MTX-II y MTX-IV pertenecen a la subclase de fosfolipasas A₂ Lys49 catalíticamente inactivas. Además, la secuencia N-terminal de las fosfolipasas A₂ básicas aisladas, demostró claramente que estas miotoxinas son similares a las miotoxinas previamente aisladas del veneno de *Bothrops asper* de Costa Rica. A Basp-I-PLA₂ es una nueva fosfolipasa A₂ ácida aislada del veneno de *Bothrops asper* de Panamá y su secuencia N-terminal reveló una alta homología con otras fosfolipasas ácidas Asp49 aisladas de venenos de serpientes.

Palabras claves: *Bothrops asper*, Panamá, caracterización de veneno de serpiente, fosfolipasas A₂, miotoxicidad, inhibición de la agregación plaquetaria, inflamación.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cladogramas e cronologia dos répteis	3
Figura 2. Tipos de movimentos das serpentes.....	4
Figura 3. Tipos de movimentos das serpentes.....	5
Figura 4. Dados estratigráficos das principais serpentes	6
Figura 5. Transformação e especialização da glândula da peçonha e dos dentes inoculadores	8
Figura 6. Espécime jovem e adulto de <i>B. asper</i> do Panamá.....	9
Figura 7. Detalhes da cabeça, glândula e dentes inoculadores de viperídeo.....	11
Figura 8. Componentes da peçonha das serpentes.....	12
Figura 9. Especificidade de hidrólises das fosfolipases	14
Figura 10. Representação da estrutura terciária da PLA ₂	20
Figura 11. Representação do mecanismo de catálise proposto para PLA ₂ s	22
Figura 12. Localização dos lugares de captura das serpentes	29
Figura 13. SDS-PAGE e Focalização isoeletrica da peçonha.....	48
Figura 14. Atividade PLA ₂ da peçonha pelo método de Dole.....	49
Figura 15. Atividade PLA ₂ da peçonha pelo método de hemólise radial indireta.....	50
Figura 16. Atividade proteolítica da peçonha sobre a fibrina.....	51
Figura 17. Atividade hemorrágica da peçonha	52
Figura 18. Atividade miotóxica da peçonha.....	53
Figure 19. Atividade edematizante da peçonha	54
Figura 20. Isolamento das PLA ₂ s	57
Figura 21. SDS-PAGE e Focalização isoeletrica das PLA ₂ s isoladas.....	58

Figura 22. Análise de espectro de massa das PLA ₂ s isoladas	59
Figura 23. Múltiplo alinhamento de sequências N-terminal das PLA ₂ s isoladas	60
Figura 24. Atividade hemolítica indirecta de PLA ₂ s básicas.....	63
Figura 25. Atividade mitotóxica das PLA ₂ s isoladas	64
Figura 26. Atividade citotóxica das PLA ₂ s básicas isoladas.....	65
Figura 27. Efeito de MTX-II, MTX-III e MTX-IV na fagocitose	66
Figura 28. Atividade fosfolipásica de BaspPLA ₂ -I	67
Figura 29. Efeito inibitório de BASP-I-PLA ₂ na agregação plaquetária	68
Figura 30. Atividade de Basp-PLA ₂ -I dependente de pH, temperatura, tempo de incubação e concentração da enzima	69
Figura 31. Atividade de Basp-PLA ₂ -I dependente de íons, cátions e íons Mn.....	70
Figura 32. Atividade de Basp-PLA ₂ -I dependente de BPB e inibidores.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação geral de fosfolipases A_2	16
Tabela 2. Fosfolipases A_2 isoladas de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	25
Tabela 3. Atividades tóxicas induzidas pela peçonha de <i>B. asper</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	ácido araquidônico
acyl-NBD	acyl-N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3 diazol-4-il)
AMBIC	tampão bicarbonato de amônio
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>B. asper</i>	<i>Bothrops asper</i>
BaspPLA ₂ -I	fosfolipase A ₂ ácida – I de <i>Bothrops asper</i>
Bis-acrilamida-N',N'	metilenobisacrilamida
BPB	brometo de <i>p</i> -bromofenacila
BSA	albumina de soro bovino
CEUA	Comitê de ética na utilização de animais
CIM	concentração inibitória mínima
CK	Creatina cinase
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CSS	Caja de Seguro Social
DHEM	dose hemolítica mínima
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
EAT	células de tumor ascítico murino de Ehrlich
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenoglicol bis (β-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraacético
<i>et. al</i>	locução latina “ e outros”
i.d.	via intradérmica
i.m.	via intramuscular
iPLA ₂ s	fosfolipases A ₂ independentes de cálcio
J774A.1	linha celular de macrófagos de camundongos
JURKAT	células de leucemia linfoblástica T humana
MEDUCA	Ministério de Educação, Panamá
MP	metaloprotease
M _r	massa relativa
MTT	Brometo de [3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
MTX	metotrexato
MTX-I	miotoxina I
MTX-II	miotoxina II
MTX-III	miotoxina III
MTX-IV	miotoxina IV
MTXs	miotoxinas

NBT	tetrazólio nitroazul
N-terminal	terminal amínico
OMS	Organização Mundial da Saúde
p/v	relação massa/volume
PA	ácido fosfatídico
PAF	fator ativador de plaquetas
PBS	solução salina tamponada em fosfato
PC	fosfatidilcolina
PE	fosfatidiletanol
PG	fosfatidilglicerol
pI	Ponto isoelétrico
PLA ₂	fosfolipase A ₂
PLA ₂ s	fosfolipases A ₂
PM	padrão de massa molecular
PPP	plasma pobre em plaquetas
PRP	plasma rico em plaquetas
PTC	feniltiocianato
PTH	aminoacilfeniltio-hidantoína
RMN	ressonância magnética nuclear
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (meio utilizando tampão bicarbonato diferentes quantidades de aminoácidos e vitaminas)
SD	desvio padrão
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
SK-Br	células de adenocarcinoma de mama humano
TCA	ácido tricloroacético
TEA	triethylamina
TEMED-N',N',N',N'	tetrametiletlenodiamina
TFA	ácido trifluoracético
Tris	tris hidroximetilaminometano
U	unidades de atividade enzimática total
UNACHI	Universidade Autônoma de Chiriquí
UP	Universidade de Panamá
USP	Universidade de São Paulo
WRP	plaquetas lavadas

1. INTRODUÇÃO

Os envenenamentos resultantes da picada de serpentes são um importante problema de saúde pública em diversas regiões do mundo, particularmente nos países tropicais e subtropicais (GUTIÉRREZ *et al.* 2006; KASTURIRATNE *et al.*, 2008).

Na América Latina, a maioria dos envenenamentos por picada de serpentes são causados por espécies do gênero *Bothrops*, sendo que o número de mortes no ano de 2007 na América Central foi de 193 a 1.461 (KASTURIRATNE *et al.*, 2008). A espécie *Bothrops asper*, distribui-se amplamente desde o sul do México, América Central e regiões ao norte da América do Sul (RUSSELL *et al.*, 1997; CAMPBELL e LAMAR, 2004), sendo a responsável pela maioria de casos nessas regiões (FAN e CARDOSO, 1995; GUTIÉRREZ, 1995; WARRELL, 2004).

No Panamá, na América Central, existe uma alta incidência de casos de picadas de serpentes de 40-65 casos por 100.000 habitantes por ano, com um total estimado de 1.300 a 1.800 casos por ano (QUINTERO, 2000; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009a).

A serpente peçonhenta, mais importante do Panamá é a espécie *B. asper* que é responsável por mais de 90% de todas as picadas de importância clínica (JUTZY *et al.*, 1953; QUINTERO, 2000). Esta situação pode ser atribuída a diversos fatores, característicos das serpentes desta espécie, tais como: ampla distribuição em regiões úmidas de terras baixas destinadas às atividades agrícolas, alta capacidade de adaptação a ambientes modificados, particularmente bosque úmido, decidual e montano baixo, também pode se encontrar em terra cultivada próxima de rios e lagos e nas proximidades das casas das vítimas (RUSSELL *et al.*, 1997; SAVAGE, 2002; SOLÓRZANO, 2004), e, conseqüentemente, ocorre o contato da *B. asper* com seres humanos e animais domésticos (MELO *et al.*, 2004). Adicionalmente, a serpente *B. asper* tem a habilidade de liberar grandes volumes de peçonha (BOLAÑOS, 1972), e é considerada muito agressiva, deste modo, é capaz de provocar envenenamentos severos (FRANÇA e MÁLAQUE, 2009).

Um grande número de vítimas por envenenamentos ocasionados pelas picadas da serpente *B. asper* conseguem sobreviver, mas com algumas sequelas físicas e fisiológicas permanentes que os incapacitam para o desenvolvimento de suas atividades. A maior parte das sequelas que apresentam as vítimas têm relação com

os efeitos dos constituintes tóxicos da peçonha que atingem e causam dano em diversas células e tecidos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009a).

1.1 AS SERPENTES

As serpentes e suas peçonhas fascinam a humanidade desde tempos remotos. No entanto, estes animais evocam sentimentos de admiração, respeito, veneração, mitificação, deificação e até periculosidade, ansiedade, terror, fobia, maldade e morte (MUNDKUR, 1976, 1978; BALAJI, 1978; BOLAÑOS, 1984; MÉIER, 1990; KNIGHT, 2008).

Na atualidade, apesar dos mitos gerados através dos anos e dos poderes atribuídos às serpentes, estes estão mudando devido ao crescente número de pesquisas desenvolvidas ao redor do importante papel que as serpentes desempenham no contexto biológico, ecológico e social (ZHOU e JIANG, 2005).

As serpentes potencialmente perigosas para o homem contêm em suas peçonhas um arsenal químico, cuja composição e efeitos biológicos têm sido refinados durante milhões de anos de evolução (YANG, 1974; DALTRY; WÜSTER; THORPE, 1996; FRY e WÜSTER, 2004; TSAI, 2007; LYNCH, 2007; FRY *et al.*, 2008). Este arsenal químico representa uma arma mortífera para as presas das serpentes e ao mesmo tempo uma farmacopéia natural abundante com enorme potencial biotecnológico e clínico que está sendo explorado em laboratórios de todo o mundo (LEWIS e GARCIA, 2003; BOGIN, 2005; MARSH e WILLIAMS, 2005; DE LIMA *et al.*, 2005; KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006; MENEZ *et al.*, 2006; GAWADE *et al.*, 2007).

As serpentes situam-se na ordem Squamata, subordem Ophidia (Serpentes) da classe Reptilia, subfilo Vertebrata, filo Chordata, do reino animal (Fig. 1A). São vertebrados (possuem vértebras), ectotérmicos (a temperatura interna do corpo varia de acordo com a temperatura do ambiente), tetrápodos (ainda que não possuam quatro membros locomotores descendem de animais com quatro patas) e amniotas (seus embriões são rodeados por uma membrana amniótica). Estima-se que há uns 310 milhões de anos os répteis descenderam dos anfíbios (Fig. 1B).

Figura 1. Cladogramas e cronologia dos répteis. A) Cronologia do desenvolvimento dos répteis. B) Cladograma da classe Reptilia com as diferentes subclasses e as ordens que a constituem.

A inovação evolutiva que permitiu aos répteis se separarem dos anfíbios e colonizarem novos ecossistemas esteve ligada à:

1. Adaptabilidade de sua locomoção, o que facilitou seu movimento em todos os ecossistemas; as especializações locomotivas das serpentes responderam as diferenças morfológicas associadas com diferentes modos de predação e as propriedades dos substratos sobre os quais se movimentam. As serpentes em geral apresentam quatro tipos de movimentos (Fig. 2): 1) ondulação lateral “serpentine”; 2) locomoção retilinear “caterpillar”; 3) locomoção em concertina, e 4) de golpe lateral “sidewinding”.

Figura 2. Tipos de movimentos das serpentes.

2. Desenvolvimento de ovos amnióticos (Fig. 3), ou seja, ovos que possuem as membranas córion, âmnion e alantóide, responsáveis pela manutenção do ambiente aquático dentro do ovo e trocas gasosas. Assim, as serpentes desenvolveram ovos que possuíam grande quantidade de vitelo (gema) que permitiam o crescimento do embrião até um estado avançado de ontogenia, sendo muito semelhante ao adulto na ocasião do nascimento, embora a nutrição do embrião possa ser fornecida pela mãe que é o caso dos répteis ovíparos. O desenvolvimento de ovos amnióticos permitiu aos répteis separarem-se dos anfíbios e colonizarem ecossistema terrestres nos quais puderam reproduzir-se sem ter a necessidade de voltar na água.

Figura 3. Desenvolvimento de ovos amnióticos no processo evolutivo das serpentes (Adaptado de LAURIN e REISZ, 1995).

Posteriormente, 40 milhões de anos atrás durante o Eoceno, apareceram serpentes pequenas e rápidas, os colubrídeos, que competem pelo alimento e nicho ecológico (FRANCO, 2009). Com o afastamento das placas tectônicas do equador alcançou sua posição atual (BRIGGS, 1987), há 20 milhões de anos, a temperatura diminuiu bruscamente e os boídeos incapazes de se adaptarem às mudanças climáticas são desapossados de seus nichos ecológicos, os quais são colonizados pelos colubrídeos que dominam a terra (FRANCO, 2009).

Os elapídeos, morfologicamente similares aos colubrídeos, poderiam ter sido separados dos colubrídeos há 20 milhões de anos atrás (Fig. 4). Os viperídeos apareceram no início do Oligoceno, há 35 milhões de anos (Fig. 4), e colonizaram nosso continente no início do Mioceno, há 22 milhões de anos (CHIPPAUX, 2006).

3. Formação e armazenamento da peçonha e evolução do aparato inoculador da peçonha que resultou ser a adaptação chave que possibilitou as serpentes peçonhentas a transição de um modo mecânico (constricção) a um modo químico (peçonha) de capturar, imobilizar, matar e digerir presas de maior tamanho que elas mesmas (KARDONG, 1982; KOCHVA, 1987; DE LOYOZA, 1994; GREENE, 1997; CARDOSO *et al.*, 2003; CHIPPAUX, 2006).

Figura 4. Dados estratigráficos das principais serpentes (Adaptado de CHIPPAUX, 2006).

De fato, ainda que a aparição da glândula da peçonha (Fig. 5A) acontecesse há 200 milhões de anos, durante a aparição dos répteis escamosos (FRY *et al.*, 2006), somente há uns 10-15 milhões de anos, que diferentes grupos de serpentes desenvolveram independentemente aparelhos de injeção da peçonha (Fig. 5B) (JACKSON, 2003). Melgarejo (2009) explica que em função das características morfológicas e funcionais dos aparelhos de injeção da peçonha (Fig. 5B), as serpentes classificam-se em:

1. Áglifa (Fig. 5B) é a dentição na qual não há dentes especializados na inoculação da peçonha. A glândula supralabial presente produz uma secreção destinada a lubrificar o alimento. Nesta categoria pode existir a categoria de homodonte (com todos os dentes iguais) e heterodonte (com alguns dentes alongados).

2. Opistóglifa (Fig. 5B) caracteriza-se pela presença de um ou mais dentes modificados na parte posterior do maxilar. Estes possuem sulcos longitudinais dos quais, por capilaridade, escorre o produto da glândula de Duvernoy's.
3. Proteróglifa (Fig. 5B) neste tipo de dentição, os dentes anteriores localizados no maxilar, geralmente apresentam um canal da peçonha não completamente fechado, estão conectados com a glândula da peçonha.
4. Solenóglifa (Fig. 5B) apresenta um único dente funcional em cada maxilar. Este dente é grande, agudo e oco e permanece paralelo ao crânio em repouso, mas gira 90º no momento do ataque, para injetar a peçonha.

É assim como no transcurso do processo evolutivo, aproximadamente 3.000 espécies de serpentes, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias, têm conseguido se adaptar e se estabelecer em diversos ambientes: terrestres, semi-arbóreos, arbóreos e aquáticos em todos os continentes, exceto a Antártica, todo o qual reflexa o sucesso evolutivo das serpentes (VITT *et al.*, 2003; VIDAL e HEDGES, 2005; LUISELLI, 2006a,b; PAUWELS *et al.*, 2008).

Figura 5. Transformação e especialização da glândula da peçonha e dos dentes inoculadores nas serpentes. A) Representação da possível transformação da glândula Duvernoy's dos colubrídeos. A glândula aparece no meio do desenvolvimento dos colubrídeos. Esta surge perto da porção posterior distal da glândula supralabial. Completada a evolução morfológica, a glândula de Duvernoy's transforma-se independentemente na glândula da peçonha (VG) de elapídeos e viperídeos. B) Representação do provável processo de especialização e transformação do maxilar e dentes acontecidos dentro da família Colubridae e as famílias Elapidae e Viperidae. No retângulo apresenta-se diagramaticamente às mudanças morfológicas no maxilar e nos dentes (Adaptado de KARDONG, 1982).

No Panamá, existem 131 espécies de serpentes das quais 21 são peçonhentas, 8 da família Elapidae, 1 da família Hydrophiidae e 12 da família Viperidae (IBAÑEZ e SOLIS, 1993; RUSSELL *et al.*, 1997).

A espécie *Bothrops asper* é a serpente peçonhenta, solenóglifa, vivípara, mais importante e de mais ampla distribuição no Panamá. São de fácil distinção por sua fosseta loreal, sua cabeça cuneiforme e pupilas elipticamente verticais (Fig. 6A). Sua cor pode ser bronzeada, chocolate, oliva, gris, rosado ou quase preto, com triângulos laterais escuros bordejados de claros cujos ápices fundem-se no meio da costa para dar a aparência de uma letra “X” sobre todo o corpo (Fig. 6B).

Figura 6. Espécimes jovem e adulto de *B. asper* do Panamá. A) Detalhes da cabeça de um espécime jovem de *B. asper* do Panamá. B) Detalhes da cor e aparência de um espécime adulto (1,2-1,8 m de comprimento) de *B. asper* do Panamá (Foto de James A. Christensen, 2008).

É uma serpente terrestre, ainda que os espécimes jovens possam ser arborícolas, sendo predadores noturnos, principalmente de roedores e pássaros.

Os envenenamentos induzem proeminentes danos locais nos tecidos, caracterizados pela formação de bolhas, edema, hemorragia, dermonecroses e mionecroses (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2009). A necrose muscular é uma séria consequência dos acidentes botrópicos que pode levar a uma perda permanente de tecido e da funcionalidade, requerendo, muitas vezes, a amputação do membro atingido.

As manifestações clínicas das alterações sistêmicas induzidas por *B. asper* incluem hemorragia, efeitos na agregação plaquetária, coagulopatias, hipotensão, alterações hemodinâmicas, edema pulmonar e falha renal aguda. Também podem ocorrer outros efeitos menos comuns tais como hemólise intravascular, dano agudo do miocárdio e se a vítima não for atendida rapidamente com antisoro pode apresentar falha múltipla de órgãos e morte (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997; SINGH *et al.*, 2000; OTERO *et al.*, 2002; WARRELL, 2004; SOARES *et al.*, 2004a; MORA *et al.*, 2008; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009a,b).

1.2 Peçonhas de serpentes

As peçonhas das serpentes são secreções tóxicas produzidas e armazenadas por um par de glândulas exócrinas localizadas na região temporal em ambos os lados da cabeça, logo atrás dos olhos, diretamente por baixo da pele (Fig. 7A).

A glândula da peçonha tem uma forma usualmente triangular no corte sagital, com base ampla voltada para a região supralabial, o vértice posterior aponta para a articulação quadrato – mandibular, o ápice para o osso parietal e a parte anterior, mais longa forma o ducto excretor que conecta a glândula aos dentes inoculadores que apresentam orifícios de entrada e de saída e terminam num extremo apical em forma de bisel (Fig. 7B) (CHIPPAUX, 2006; MACKESSY e BAXTER, 2006; ANGULO e LOMONTE, 2008; MELGAREJO, 2009).

O complexo mecanismo inoculador dos viperídeos permite a eles proezas como atacar e injetar a peçonha em apenas 1/50 de segundo, ou abrir a boca apenas o ângulo suficiente para poder morder, conforme o tamanho da vítima (MELGAREJO, 2009).

Figura 7. Detalhes da cabeça, glândula e dentes inoculadores de viperídeo. A) Cabeça de viperídeo mostrando a localização da glândula de peçonha, o ducto excretor e os dentes inoculadores. B) Detalhes estruturais dos dentes inoculadores (Adaptado de BUSTAMANTE *et al.*, 2007).

As secreções tóxicas da peçonha são misturas complexas de diversas moléculas de natureza orgânica que incluem carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, aminoácidos, nucleotídeos, proteínas, peptídeos, e componentes inorgânicos, tais como, cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco (Fig. 8).

Entretanto, a maior parte das substâncias presentes nas peçonhas das serpentes são proteínas, que correspondem a cerca de 90 a 95% do peso seco da peçonha, muitas das quais apresentam atividade enzimática (YANG, 1974; KOH *et al.*, 2006; CHIPPAUX, 2006; RAMOS e SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; ANGULO e LOMONTE, 2008) e contribuem na imobilização e morte rápida da presa e de vítimas humanas; na lubrificação da presa no seu passo pelo esôfago e na sua digestão, assim como na defesa contra predadores (KARDONG, 1982; CUNDALL e DEUFEL, 2006; MACKESSY e BAXTER, 2006; LYNCH, 2007).

Figura 8. Componentes da peçonha das serpentes (Adaptado de RAMOS e SELISTRE-DE ARAUJO, 2006).

As famílias das proteínas presentes nas peçonhas das serpentes da família Viperidae incluem enzimas e proteínas sem atividade enzimática (Fig. 8). O perfil protéico e a abundância relativa dos diferentes grupos de proteínas variam amplamente de espécie a espécie.

A natureza e propriedades biológicas dos diversos componentes das peçonhas das serpentes são peculiares para cada espécie (ASSAKURA *et al.*, 1992). A variabilidade na composição da peçonha de serpente é um fenômeno ubíquo em todos os níveis taxonômicos (CHIPPAUX *et al.*, 1991). Esta variabilidade na composição da peçonha pode estar relacionada com diversos fatores, tais como: distribuição geográfica, condições naturais, idade do animal, tamanho, sexo, hábitos

alimentares, sazonalidade, caráter individual (CHIPPAUX *et al.*, 1991; FERREIRA *et al.*, 1992).

Alape-Girón *et al.* (2008) sugerem que diferenças na composição da peçonha em diferentes regiões geográficas pode ser devido a pressões ambientais evolutivas que atuam em diferentes populações isoladas. Devido aos problemas potenciais existentes na efetividade, seleção e produção do antisoro, assim como na replicabilidade dos resultados nos estudos toxinológicos este tema desperta um grande interesse acadêmico-científico (CHIPPAUX *et al.*, 1991; WÜSTER *et al.*, 1999; SASSA, 1999).

É importante ressaltar a grande variedade de isoformas de cada família protéica presente nas peçonhas das serpentes, fato este que contribui à complexidade na composição protéica e a grande diversidade dos efeitos biológicos das peçonhas.

A presença de múltiplas isoformas de uma proteína evidencia a ocorrência de duplicações gênicas, e a grande diversidade estrutural de cada família multigênica indicando a ação de uma evolução acelerada das toxinas (OHNO *et al.*, 1997, 2002; KORDIS *et al.*, 2002).

Portanto, não é novidade que tenham sido descritas diversas atividades biológicas associadas a membros da mesma família protéica. Assim, por exemplo, diferentes isoenzimas das fosfolipases A₂ provocam hemólise, miotoxicidade, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, edema e atividade anti ou procoagulante (KINI, 2003; OHNO *et al.*, 2003).

1.3 Fosfolipases A₂

As fosfolipases são proteínas amplamente distribuídas na natureza e agrupam-se de acordo com a sua especificidade no sítio de hidrólise na molécula do fosfolípido em: A₁, A₂, B, C e D (Fig. 9). De todas as enzimas presentes nas peçonhas e secreções das serpentes, as fosfolipases A₂ são as mais comumente encontradas e estudadas, não somente pelas suas propriedades químicas, mas também pela sua importância biológica (KINI, 2003). As fosfolipases A₂ catalisam de modo específico a hidrólise da ligação 2-acil-éster, da molécula de 1,2-diacilglicerolfosfolípido, liberando o ácido graxo da posição 2 (Fig. 9) e um lisofosfoglicerídeo. Os lisofosfoglicerídeos são intermediários no metabolismo dos diacilglicerolfosfolídeos, e, em concentrações elevadas são agentes hemolíticos,

tóxicos e causam dano nas membranas celulares (DIAZ e ARM, 2003; SCHALOSKE e DENNIS, 2006; WAGNER e BREZESINSKI, 2008). A atividade catalítica sobre membranas sugere um importante papel das fosfolipases das peçonhas de serpentes (svPLA₂s) em sua toxicidade. O desarranjo dos componentes fosfolipídicos está associado a severas alterações na integridade estrutural e funcional das membranas celulares com conseqüente influxo de íons cálcio (GUTIÉRREZ *et al.*, 1989), que acarreta a liberação de proteases dependentes de cálcio (DUNCAN, 1978), ativação de PLA₂s endógenas (TRUMP, 1996) e colapso mitocondrial (GOPALAKRISHNAKONE *et al.*, 1984). As somatórias de todas essas alterações moleculares poderiam resultar em morte celular.

Figura 9. Especificidade de hidrólises das fosfolipases. Especificidade de hidrólise numa molécula de 1,2-diacylglicerolfosfolípido pelas fosfolipases (Estrutura desenhada no Software ACD/I Lab. via Chem. Sketch – Freeware Version 1994 - 2009).

As fosfolipases A_2 constituem uma superfamília de proteínas constituída por 15 grupos e seus subgrupos (Tabela 1) (SCHALOSKE; DENNIS, 2006) que podem apresentar diversas sequências, estrutura tridimensional, função, localização, regulação e mecanismos enzimáticos diversos ou diversificados (DENNIS, 1997; TISCHFIELD, 1997; MAXEY e MACDONALD, 1998; SCHALOSKE e DENNIS, 2006).

Em função desses critérios propõem-se 5 tipos de enzimas (Tabela 1): PLA_2 s secretadas, citosólicas e PLA_2 s lisossomais (agrupadas de acordo com a sua localização), PLA_2 s independentes de cálcio (de acordo com os requerimentos de cálcio para sua atividade) e o fator ativador de plaquetas ou PAF- PLA_2 (conforme sua função biológica) (Tabela 1).

Com o surgimento de uma grande variedade destas enzimas na década passada, pesquisas na área estão em expansão e com isso mais PLA_2 s deverão ainda ser descobertas (DENNIS, 2000; SIX e DENNIS, 2000; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

Estas proteínas têm uma função central em diversos processos celulares, entre eles: digestão de fosfolipídios, metabolismo, defesa, transdução de sinais (DENNIS, 1994; DENNIS, 1997; KINI, 1997), além disso, provêm precursores para síntese de mediadores inflamatórios como prostaglandinas e fator ativador de plaquetas (DENNIS, 1994; TISCHFIELD 1997; OWNBY *et al.* 1999; DESSEN, 2000a; SCHALOSKE e DENNIS, 2006).

Tabela 1 Classificação geral de fosfolipases A₂

Grupo	Fonte	Massa molecular (kDa)	Características
sPLA₂s Secretadas			
IA	Elapídico e Hidrofilídico	13–15	7 pontes dissulfeto
IB	Pâncreas suíno e humano	13–15	7 pontes dissulfeto
IIA	Crotálicas, fluido sinovial humano	13–15	7 pontes dissulfeto
IIB	Víbora de Gaboon	13–15	6 pontes dissulfeto
IIC	Testículo de rato e murino	15	8 pontes dissulfeto
IID	Baço/pâncreas humano e murino	14–15	7 pontes dissulfeto
IIE	Cérebro/coração/útero humano e murino	14–15	7 pontes dissulfeto
IIF	Testículo/embrião humano e murino	16–17	6 pontes dissulfeto
V	Macrófago/pulmão/coração de humano e murino	14	6 pontes dissulfeto
IX	Caracol (conodípine-M)	14	6 pontes dissulfeto
X	Leucócito/timo/baço humanos	14	6 pontes dissulfeto
XIA	Broto verde de arroz (PLA2-I)	12.4	6 pontes dissulfeto
XIB	Broto verde de arroz (PLA2-II)	12.9	6 pontes dissulfeto
XII	Humano/murino	19	7 pontes dissulfeto
XIII	Parvovirus	<10	sem pontes dissulfeto
XIV	Fungo simbiótico/bactéria	13–19	2 pontes dissulfeto
cPLA₂s Citosólicas			
IVA	Humano/murino	85	Domínio C2
IVB	Humano	114	Domínio C2
IVC	Humano	61	Acilado
IVD	Humano/murino	92–93	Domínio C2
IVE	Murino	100	Domínio C2
IVF	Murino	96	Domínio C2

(Adaptado de SCHALOSKE e DENNIS, 2006).

Tabela 1 (Continuação) Classificação geral de fosfolipases A₂

Grupo	Fonte	Massa molecular (kDa)	Características
iPLA ₂ s Independentes de Ca ²⁺			
VIA-1	Humano/murino	84–85	8 repetições
VIA-2	Humano/murino	88–90	7 repetições
VIB	Humano/murino	88–91	Ligada a membrana
VIC	Humano/murino	146	Proteína integral de membrana
VID	Humano	53	Acilglicerol transacetilase, triacilglicerol lipase
VIE	Humano	57	Acilglicerol transacetilase, triacilglicerol lipase
VIF	Humano	28	Acilglicerol transacetilase, triacilglicerol lipase
PLA ₂ s - PAF-AH (Fator agregador de plaquetas – Acil hidrolases)			
VIIA	Humano, murino, suíno, bovino	45	Secretada, α/β hydrolase
VIIIB	Humano, bovino	40	Intracelular, PAF α/β hydrolase
VIIIA	Humano	26	Intracelular, tríade Ser/His/Asp, homodímero ou heterodímero (GVIIIB associados a subunidade β)
VIIIB	Humano	26	Intracelular, tríade Ser/His/Asp, homodímero ou heterodímero (GVIIIA associados a subunidade β)
PLA ₂ s Lisossomais			
XV	Humano, murino, bovino	45 (deglicosilada)	Tríade Ser/His/Asp, glicosilada, sequência sinal N-terminal

(Adaptado de SCHALOSKE e DENNIS, 2006).

As PLA₂s das peçonhas de serpentes têm sido classificadas dentro dos grupos I (Elapidae/Hydrophiidae) e II (Crotalidae/Viperidae) considerando sua estrutura primária e padrão de pontes dissulfeto (SIX e DENNIS, 2000). Usualmente, as fosfolipases A₂ de serpentes do grupo II são também subdivididas em dois grandes subgrupos: as PLA₂s Asp49, que possuem um ácido aspártico na posição 49 e elevada atividade catalítica; e as PLA₂s Lys49 que possuem uma lisina substituta na posição 49 com pouca ou nenhuma atividade catalítica (MARAGANORE *et al.*, 1984; ARNI e WARD, 1996; SOARES *et al.*, 2004a; WEI *et al.*, 2006). Apesar de inativas cataliticamente, as PLA₂s Lys49 demonstram atividade lítica sobre membranas através de um mecanismo independente de cálcio (OWNBY *et al.*, 1999; SÁ *et al.*, 2005; ANGULO *et al.*, 2005)

Estudos com peptídeos sintéticos, mapeando sítios de interação com moléculas neutralizantes, e mutagênese sítio dirigida tem demonstrado que uma região molecular contendo aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos presentes na região C-terminal das PLA₂s Lys49 é essencial para sua atividade miotóxica, bactericida e sobre lipossomos (LOMONTE *et al.*, 2003).

Curiosamente a atividade enzimática das PLA₂s pode ser um fator que contribui para o desenvolvimento de alguns efeitos tóxicos, embora não seja a única razão responsável pela toxicidade destas proteínas. Alguns pesquisadores, utilizando modificações químicas de aminoácidos (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000; SOARES e GIGLIO, 2003; SOARES *et al.*, 2004b), anticorpos (LOMONTE *et al.*, 1992; RUCAVADO e LOMONTE, 1996) e mutagênese contra domínios específicos das PLA₂s (WARD *et al.*, 2002; CHIOATO e WARD, 2003) têm mostrado a existência de uma separação funcional entre a atividade enzimática e atividade tóxica de algumas enzimas devido à presença de diferentes domínios estruturais responsáveis por estes efeitos. Entretanto, ainda que exista uma separação funcional entre a atividade enzimática e tóxica de algumas PLA₂s, a maioria das proteínas que pertencem à superfamília das PLA₂s apresentam uma semelhança estrutural significativa de domínios bem conservados, e definidos pela sequência (D₄₂XCCXXHD₄₉) representante do sítio catalítico e o sítio de ligação ao cálcio (X₂₇CGXGG₃₂), nas svPLA₂s do grupo II, cataliticamente ativas (DUFTON *et al.*, 1983; KINI, 1997; DÍAZ *et al.*, 2003; BORTOLETO-BUGS *et al.*, 2004; BAHNSON, 2005).

Em adição ao seu papel catalítico normal, as fosfolipases A₂ de serpentes demonstram outros efeitos tóxico-farmacológicos importantes incluindo: miotoxicidade, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, hemólise, hipotensão, anticoagulante, inibição e/ou iniciação da agregação plaquetária, atividade indutora de edema, convulsão, bactericida, antitumoral, antiparasitário e antiviral (FENARD *et al.*, 1999; OWNBY *et al.*, 1999; SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2004; FULY *et al.*, 2004; STÁBELI *et al.*, 2006). Algumas dessas atividades são relacionadas com a atividade enzimática, mas outras são completamente independentes (KINI e EVANS, 1989; SOARES e GIGLIO, 2003).

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

Devido a sua relativa abundância em várias fontes naturais, a fácil purificação e alta estabilidade, as PLA₂s estão entre as enzimas melhor estudadas e muitas delas possuem sua estrutura terciária determinada, por exemplo, a piratoxina-III isolada da peçonha de *Bothrops pirajai* (RIGDEN *et al.*, 2002), a miotoxina-I de *Bothrops moojeni* (MARCHI-SALVADOR *et al.*, 2005) e a BthA-I-PLA₂ de *Bothrops jararacussu* (MAGRO *et al.*, 2005).

A estrutura terciária conservada das svPLA₂s (Fig. 10) é constituída por duas α -hélices antiparalelas (hélice 2 e 3) com características anfipáticas, nas quais os resíduos hidrofílicos estão expostos ao solvente e os resíduos hidrofóbicos dispostos no interior. Os resíduos polares do sítio catalítico (His48, Asp49, Asp99 e Tyr52) estão situados no interior destas duas α -hélices, representando então a exceção para a distribuição descrita anteriormente. As PLA₂s são também constituídas por uma região N-terminal, representada por uma α -hélice 1 (resíduos 1 a 12). Em seguida está localizada uma hélice menor (*short helix*) formada pelos resíduos 18-23. Entre os resíduos 25-34 está o alça ligante de cálcio, seguido pela α -hélice 2 (resíduos 40 a 55) a qual se liga a folha β curva antiparalela (β -wing) (resíduos 75 a 77 e 82 a 84). Após a região da folha β curva antiparalela, está a α -hélice 3 (resíduos 90 a 107) que se liga a uma região bastante flexível, denominada alça C-

terminal (resíduos 108 a 113). A presença de 7 pontes dissulfeto nas posições entre Cys51-Cys133 e a extensão C-terminal de 5-7 aminoácidos é característica das PLA₂s do grupo II (RENETSEDER *et al.*, 1985; ARNI e WARD, 1996).

Figura 10. Representação da estrutura terciária da PLA₂. Representação da estrutura terciária da PLA₂ SIIISPIIB de *Bothrops jararacussu*. O íon cálcio representado como uma grande esfera azul celeste (azul céu) e as pontes dissulfeto, delineadas como linhas finas amarelas. (Adaptado de KETELHUT *et al.*, 2003).

O mecanismo catalítico da reação PLA₂-fosfolipídio envolve o ataque nucleofílico de uma molécula de água na ligação 2 do substrato fosfolipídio (Fig. 11A). No modelo proposto, o próton na posição 3 do anel imidazólico do resíduo His48 envolvido, em uma forte interação com o grupo carboxilato do Asp99, impede que ocorra rotação do anel imidazólico e mantém o nitrogênio da posição 1 deste anel em posição espacial apropriada. Uma molécula de água promove então o ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do substrato, e nesse momento o anel imidazólico da His48 recebe um próton da molécula de água, facilitando a reação.

Subsequentemente a hidrólise da ligação acil-éster na posição 2 do fosfolipídio, este próton é doado pelo anel imidazólico para o oxigênio que forma então o grupo álcool do lisofosfolípídeo a ser liberado juntamente com o ácido graxo (VERHEIJ *et al.*, 1980; ARNI e WARD, 1996; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007). O íon Ca²⁺, coordenado pelo resíduo Asp49, uma molécula de água e os átomos de oxigênio dos resíduos Gly30, Trp31 e Gly32 (Fig. 11 B), são responsáveis pela estabilização do intermediário reativo (ARNI e WARD, 1996).

A relação estrutura-função de diversas enzimas homólogas às PLA₂s das peçonhas de serpentes têm sido amplamente pesquisada, com o emprego de grande variedade de metodologias, desde a tradicional modificação química de aminoácidos específicos e o consequente efeito nas atividades enzimáticas e farmacológicas, considerada a principal estratégia de estudo na tentativa de elucidar o mecanismo de ação destas proteínas multifuncionais, e até mesmo mutagênese sítio dirigida, técnicas espectrofotométricas, cristalográficas e ressonância magnética nuclear, além de estudos de ligação com inibidores e substratos naturais e artificiais (OWNBY *et al.*, 1999; SOARES; GIGLIO, 2003; SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004).

Figura 11. A) Representação esquemática do mecanismo de catálise proposto para PLA₂s. Interação dos resíduos do sítio catalítico de sPLA₂s e do íon cálcio com o estado de transição da reação catalítica no qual uma molécula de água polarizada pelos resíduos H48 e D99 se liga ao grupo carbonila do substrato (VERHEIJ *et al.*, 1980). B) Posição do íon Ca²⁺, esfera azul celeste (azul céu) e os ligantes de coordenação, em vermelho, responsáveis pela estabilização do intermediário reativo.

O envenenamento causado por peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* induz liberação de substâncias farmacologicamente ativas com efeitos locais agudos como proteólise, hemorragia, edema e necrose tecidual além de efeitos sistêmicos como coagulação sanguínea e choque. A necrose muscular é uma séria consequência das picadas por serpentes *Bothrops* que pode levar a uma perda permanente de tecido e da habilidade, requerendo a amputação do membro atingido. A mionecrose pode ocorrer por efeito indireto, como consequência de degeneração e isquemia causadas por metaloproteases hemorrágicas presentes na peçonha das serpentes *Bothrops*, e que afetam a perfusão sanguínea ao tecido muscular levando aos miócitos num ponto sem retorno onde são ativados mecanismos intracelulares de morte celular ou por ação direta de fosfolipases A₂ miotóxicas sobre a membrana plasmática de células musculares (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; OWNBY *et al.*, 1999; SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004).

Durante os últimos 20 anos houve um aumento no interesse de estudo de componentes da peçonha responsáveis pela mionecrose e seu modo de ação, resultando no isolamento e caracterização estrutural e funcional de várias PLA₂s da peçonha do gênero *Bothrops* (Tabela 2) (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; ARNI; WARD, 1996; OWNBY *et al.*, 1999; SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004).

As PLA₂s miotóxicas isoladas das peçonhas de serpentes botrópicas são usualmente proteínas de caráter básico e hábeis para produzir efeitos tóxicos, ponto isoelétrico variado entre 7.0 e 10.0, que apresentam atividade catalítica (Asp49) ou "não" (Lys49), sobre substratos artificiais, como as bothropstoxina-I e II ambas da peçonha de *B. jararacussu* e as miotoxinas I e II isoladas da peçonha de *B. moojeni* (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 1998).

As PLA₂s ácidas isoladas do gênero *Bothrops* não apresentavam toxicidade experimental, mas induziam importantes efeitos farmacológicos como inibição da agregação plaquetária e hipotensão arterial (SERRANO *et al.*, 1999; ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2002). Exceções para as PLA₂s ácidas e tóxicas isoladas, até o momento, deste mesmo gênero: uma de *Bothrops alternatus* reportada por induzir hemorragia no pulmão e necrose em células do músculo cardíaco de murinos (NISENBOM *et al.*, 1986a); duas isoformas de *Bothrops insularis*, denominadas BinTXs, que induzem edema, neurotoxicidade e miotoxidade (COGO *et al.*, 2006); uma isolada de *B. neuwiedi pauloensis*, agora reclassificada como *Bothrops pauloensis*, denominada de Bp-PLA₂ que induz mionecrose (RODRIGUES *et al.*,

2004) e, outra recentemente isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*, com atividade miotóxica e denominada de BmooTX-I (SANTOS-FILHO *et al.*, 2008).

Fuly *et al.* (2000) demonstraram que PLA₂s ácidas da peçonha de *Lachesis muta* também eram capazes de induzir mionecrose e inibir a agregação plaquetária. Estas enzimas de caráter ácido ainda merecem maiores estudos na tentativa de correlacionar melhor a compreensão de seu mecanismo de ação enzimático e tóxico, e de suas possíveis aplicações farmacológicas.

Na América Central só a peçonha de populações de *B. asper* da Costa Rica (GUTIÉRREZ *et al.*, 1980; ARAGÓN e GUBENSEK, 1981; ALAPE-GIRÓN *et al.*, 2008; ANGULO e LOMONTE, 2008), Honduras (ROJAS *et al.*, 1987), Guatemala (SARAIVA *et al.*, 2001), México (ALAGÓN *et al.*, 1980) e alguns países da América do Sul (KUCH *et al.*, 1996) têm sido objeto de estudos intensivos.

Devido à variabilidade intra-espécie na composição e na toxicidade da peçonha faz-se necessário a caracterização da peçonha de serpentes ainda não estudadas, como a espécie *B. asper* do Panamá, pois podem contribuir para a pesquisa básica, produção de antisoros, diagnóstico e tratamento clínico do acidente ofídico e desenvolvimento de novas ferramentas de pesquisas e drogas de potencial uso clínico.

Tabela 2. Fosfolipases A₂ isoladas de serpentes do gênero *Bothrops*

PLA ₂ s	Espécie	pI	Mr	Referência
Miotoxina-I (Asp49)	<i>B. asper</i>	8,7	13.981	GUTIÉRREZ <i>et al.</i> , 1984.
Miotoxina-II (Lys49)		9,1	13.739	LOMONTE e GUTIÉRREZ, 1989.
Miotoxina-III (Asp49)		9,1	13.789	KAISER <i>et al.</i> , 1990.
Miotoxina-IV (Lys49)		9,1	13.886	DÍAZ <i>et al.</i> , 1995
PLA I (Asp49)		-	32	FERLAN e GUBENSENK, 1978
PLA II (Asp49)		-	16	FERLAN e GUBENSENK, 1978
PLA ₂ I (Asp49)		-	11	ALÁGON <i>et al.</i> , 1980
PLA ₂ 2 (Asp49)		-	11	ALÁGON <i>et al.</i> , 1980
PLA ₂ 3 (Asp49)		-	29	ALÁGON <i>et al.</i> , 1980
MTX-I (Asp49)		8,2	14,156	*QUINTERO <i>et al.</i> , 2009
MTX-II Lys49)		8,2	14.249	*QUINTERO <i>et al.</i> , 2009
MTX-III (Asp49)		8,2	14.253	*QUINTERO <i>et al.</i> , 2009
MTX-IV Lys49)		8,3	-	*QUINTERO <i>et al.</i> , 2009
Basp-I-PLA ₂ (Asp49)		4,6	14,246	*QUINTERO <i>et al.</i> , 2009
PLA ₂ (Asp49)	<i>B. alternatus</i>	5,04	15.000	NISENBON <i>et al.</i> , 1986.
BaTX-PLA ₂ (Lys49)		8,63	13.898	PONCE-SOTO <i>et al.</i> , 2007.
BaPLA ₂ -I (Lys49)	<i>B. atrox</i>	9,1	15.000	KANASHIRO <i>et al.</i> , 2002.
BaPLA ₂ -III (Asp49)		6,9	15.000	KANASHIRO <i>et al.</i> , 2002.
Miotoxina-I (Lys49)		8,9	13.826	NÚÑEZ <i>et al.</i> , 2004.
Miotoxina (Asp49)		-	13.500	LOMONTE <i>et al.</i> , 1990.
BE-I-PLA2 (Asp49)	<i>B. erythromelas</i>	4,67	13.649	DE ALBUQUERQUE MODESTO <i>et al.</i> , 2006.
godMT-I (Asp49)	<i>B. godmani</i>	8,2	14.300	DÍAZ <i>et al.</i> , 1992.
godMT-II (Lys49)		8,6	13.713	DÍAZ <i>et al.</i> , 1992.

* Manuscrito submetido para publicação.

Tabela 2 (cont.) Fosfolipases A₂ isoladas de serpentes do gênero *Bothrops*

PLA ₂ s	Espécies	pl	M _r	Referência
BIntX-I (Asp49)	<i>B. insularis</i>	5,05	13.975	COGO <i>et al.</i> , 2006.
BIntX-II (Asp49)		4,49	13.788	COGO <i>et al.</i> , 2006.
PLA ₂ (Asp49)	<i>B. jararaca</i>	4,5	14.303	MACHADO <i>et al.</i> , 1993.
BthA-I-PLA ₂ (Asp49)	<i>B. jararacussu</i>	4,5	13.700	ANDRIÃO-ESCARSO <i>et al.</i> , 2002.
BthX-I (Lys49)		8,2	13.800	HOMSI-BRANDEBURGO <i>et al.</i> , 1988.
BthX-II (Asp49)		7,7	15.700	HOMSI-BRANDEBURGO <i>et al.</i> , 1988.
SIISPIIA (Asp49)		5,3	15.000	KETELHUT <i>et al.</i> , 2003.
SIISPIIB (Asp49)		5,3	15.000	KETELHUT <i>et al.</i> , 2003.
SIISPIIIA (Asp49)		5,3	15.000	KETELHUT <i>et al.</i> , 2003.
SIISPIIIB (Asp49)		5,3	15.000	KETELHUT <i>et al.</i> , 2003.
Bj-IV (Asp49)		7,83	15.000	PONCE-SOTO <i>et al.</i> , 2007.
Bj-V (Asp49)		7,99	14.039	PONCE-SOTO <i>et al.</i> , 2007.
PLA ₂ (Asp49)	<i>B. lanceolatus</i>	4,9	14.500	LOBO DE ARAÚJO <i>et al.</i> , 1994.
bIK-PLA ₂ (Lys49)	<i>B. leucurus</i>	-	14.000	HIGUCHI <i>et al.</i> , 2007.
bID-PLA ₂ (Asp 49)		-	14.000	HIGUCHI <i>et al.</i> , 2007.
MjTX-I (Lys49)	<i>B. moojeni</i>	8,9	13.737	SOARES <i>et al.</i> , 2000.
MjTX-II (Lys49)		8,9	13.887	SOARES <i>et al.</i> , 1998.
BmootX-I (Asp49)		4,2	15.000	SANTOS-FILHO <i>et al.</i> , 2008
P1 (Asp49)	<i>B. neuwiedi</i>	4,8	15.000	DANIELE <i>et al.</i> , 1995.
P2 (Asp49)		4,6	16.000	DANIELE <i>et al.</i> , 1995.
P3 (Asp49)		-	15.000	DANIELE <i>et al.</i> , 1997.
BnSP-6 (Lys49)		8,2	13.500	RODRIGUES <i>et al.</i> , 1998.
BnSP-7 (Lys49)		8,9	13.726	RODRIGUES <i>et al.</i> , 1998.

Tabela 2 (cont.) Fosfolipases A₂ isoladas de serpentes do gênero *Bothrops*.

PLA ₂ s	Espécies	pI	Mr	Referência
Miotoxina-I (Lys49)	<i>B. nummifer</i>	-	16.000	GUTIÉRREZ <i>et al.</i> , 1986a.
Miotoxina-II (Lys49)		-	16.000	ÀNGULO <i>et al.</i> , 2000.
Miotoxina-IV (-)		10,6	15.000	BRUSÉS <i>et al.</i> , 1993.
BnpTX-I (Asp49)	<i>B. pauloensis</i>	7,8	14.000	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2004.
BnpTX-II (Asp49)		7,8	14.000	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2004.
Bp-PLA ₂ (Asp49)		4,3	15.800	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2007.
PrtX-I (Lys49)	<i>B. pirajai</i>	8,9	13.729	MANCUSO <i>et al.</i> , 1995.
PrtX-II (Lys49)		9,0	13.744	TOYAMA <i>et al.</i> , 1995.
PrtX-III (Asp49)		8,5	13.867	TOYAMA <i>et al.</i> , 1999.
Bpir-I-PLA ₂		4,9	14.500	*TEIXEIRA <i>et al.</i> 2008
Pra-I (Asp49)	<i>B. pradoi</i>	-	15.000	MORA-DA-SILVA <i>et al.</i> , 1991.
Miotoxina-I (Lys49)	<i>B. schelegelii</i>	9,3	16.000	ÀNGULO <i>et al.</i> , 1997.
BbTX-II (Asp49)	<i>B. brazili</i>	8,7	~14.000	HUANCAHUIRE-VEJA <i>et al.</i> , 2009
BbTX-III (Lys49)		8,46	~14.000	HUANCAHUIRE-VEJA <i>et al.</i> , 2009

* Manuscrito em elaboração

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Isolamento e a caracterização bioquímica, funcional e estrutural de fosfolipases A_2 da peçonha de *Bothrops asper* do Panamá.

2.2 Específico

2.2.1. Caracterização bioquímica e toxicológica da peçonha de *B. asper* do Panamá.

2.2.2. Isolamento de PLA_2 s através da associação de métodos cromatográficos (troca iônica em CM -Sephadex e interação hidrofóbica em Fenil -Sephadex).

2.2.3. Caracterização bioquímica de PLA_2 s: determinação da massa molecular, grau de pureza e ponto isoelétrico.

2.2.4. Caracterização funcional de PLA_2 s: atividade fosfolipásica, efeito sobre plaquetas, sobre o metabolismo oxidativo celular e a atividade fagocítica, mitotóxica, citotóxica, bactericida, fungicida, antitumoral.

2.2.5. Caracterização estrutural de PLA_2 s: determinação da composição e sequenciamento direto de aminoácidos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Peçonha

A peçonha foi adquirida de serpentes adultas *Bothrops asper* do Panamá capturadas em Caldera (latitude: 8°39'6.37"N; longitude: 82°23'30.18" O) e Gómez (latitude 8°35'12.04"N, longitude 82°44'16.38"O) na Província de Chiriquí e em Arraiján (latitude 9°04'58.66"N, longitude 79°41'26.66"O) na província do Panamá (Fig. 12), por Aristides Quintero Rueda, CSS-UNACHI, e Isela González Rodríguez, bióloga do MEDUCA com a colaboração da Dra. Ida Sano Martins do Instituto Butantan e do Dr. Wilson Fernandes do serpentário do Instituto Butantan e mantidas no cativeiro no serpentário do Gamboa Rain Forest Resort, Panamá. A peçonha bruta foi obtida por manipulação manual das serpentes mediante picada em um copo de coleta coberto com papel parafilme. A peçonha foi centrifugada a 1000 xg por 15 minutos, e o sobrenadante foi liofilizado e armazenado a -20°C no Departamento de Microbiologia da Universidade do Panamá com a colaboração da Prof. Dra. Nora Ortiz de Moreno.

Figura 12. Localização dos lugares de captura das serpentes *Bothrops asper*. (Mapa gerado e adaptado com o software Google Earth versão 5.0.1. A altitude do ponto de vista corresponde a 1, 014.41 km.)

3.2 Animais

Para o estudo das atividades, biológicas da peçonha utilizaram-se camundongos machos, linhagem Suíça (Swiss), pesando entre 18 a 22 gramas. Os animais foram adquiridos do Biotério Central do campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto e foram mantidos em local e condições adequados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a aprovação do comitê de ética na utilização de animais da Universidade de São Paulo (CEUA no. 06.1.291.53.3).

3.3 Reagentes e equipamentos

- Bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3 , AMBIC), (Vetec)
- Carboximetil-Sepharose (CM-Sepharose), (2,0 x 20 cm), (Pharmacia Biotech)
- Ácido trifluoracético (TFA), (Merck)
- Acetonitrila (Merck)
- Metanol (Synth)
- Centrifuga Excelsa II (FANEM)
- Espectrofotômetro (GENESYS)
- Coletor automático (Pharmacia Biotech – RediFrac)
- Bomba peristáltica (Pharmacia Biotech)
- Colunas de vidro para cromatografias (150 cm x 1,5 cm)
- AMICON Modelo 8050 (MILLIPORE)
- Membrana de ultracentrifugação (MILLIPORE)
- Sulfato de cobre hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), (Acrós Organics)
- Hidróxido de sódio (NaOH), (Synth)
- Acrilamida e Bis-acrilamida ($\text{N}'\text{,N}'$ -metilenobisacrilamida), (Sigma Chem. Co)
- $\text{N}'\text{,N}'\text{,N}'\text{,N}'$ – tetrametiletilenodiamino (TEMED), (Sigma Chem. Co)
- Dodecil sulfato de sódio (SDS), (Pharmacia Biotech)
- *Coomassie Brilliant Blue* G-250 (Sigma Chem. Co)
- Azul de bromofenol (Merck)
- β -mercaptoetanol (Pharmacia Biotech)
- Persulfato de amônio (Pharmacia Biotech)
- Tris-base (Sigma Chem. Co)
- Padrões de peso molecular para proteínas de Mr 10.000-250.000 (Sigma)
- Glicina (Sigma Chem. Co)

- Tris (Invitrogen)
- Ácido clorídrico (HCl), (Synth)
- Ácido acético (C₂H₄O₂), (Synth)
- Sacarose (Synth)
- Aparelho: *Electrophoresis Power Supply* EPS 601, (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)
- Buffalyte (Pierce)
- Papel Whatman número 3
- Papel da LKB de 1,0 x 0,5 cm
- Ácido fosfórico (H₃PO₄), (Synth)
- Banho (CIENTEC)
- Azida sódica (Sigma Chem. Co)
- Soroalbumina bovina (BSA), (Sigma Chem. Co)
- Triton-X100 (Pharmacia Biotech)
- Peroxidase de rábano Tipo IV (Sigma Chem. Co)
- Kit CK-NAC cinético (BioClin)
- Soro fetal bovino (SFB), (Sigma Chem. Co)
- Fosfatidilcolina (Sigma Chem. Co)
- Diacetilfosfato (Sigma Chem. Co)
- Brometo de p- bromofenacila (BPB), (Sigma Chem. Co)
- EDTA (Sigma Chem. Co)
- EGTA (Sigma Chem. Co)
- Heparina (Sigma Chem. Co)
- Paquímetro de baixa pressão 0,01mm, (Mitutoyo, Japão)
- NBD-fosfatidilcolina (PC), NBD-fosfatidilglicerol (PG),
NBD-fosfatidiletanolamina (PE) e ácido fosfatídico (PA)
fluorescentes (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA.)

Todos os reagentes utilizados no sequenciamento e determinação da composição em aminoácidos foram de grau analítico obtidos da Merck, Aldrich ou Pharmacia Biotech.

3.4. Métodos

3.4.1 Isolamento de Fosfolipases A₂

3.4.1.1 Preparação da amostra

Cerca de 300 mg da peçonha bruta cristalizada foram suspensas em 1,5 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC, NH_4HCO_3) 0,05 M, pH 8,1 e centrifugado a 1.530 xg por 10 minutos a 4°C, em centrífuga Excelsa Baby I. Alíquotas do sobrenadante foram retiradas para dosagem de proteínas e monitoramento em espectrofotômetro Beckman DU-640 a 280 nm, e o restante foi submetido ao primeiro passo cromatográfico.

3.4.1.2 Cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose

A cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose foi realizada conforme descrito por Soares e colaboradores (1998). A amostra da peçonha foi aplicada em uma coluna contendo resina CM-Sepharose, equilibrada em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH 8,1, e eluída no mesmo tampão com gradiente de concentração até 1 M. Para tanto, foi utilizado um fluxo de 1,5 mL/min, coletando-se frações de 3,5 mL/tubo monitoradas em 280nm em espectrofotômetro. As frações referentes ao primeiro pico (Ba-1) de cada etapa foram agrupadas e posteriormente liofilizadas. As medidas de condutividade foram realizadas em condutivímetro Beckman modelo RC-16C. Os picos obtidos foram analisados em SDS-PAGE e quanto à atividade fosfolipásica e miotóxicas selecionando-se as frações com as proteínas de interesse.

Os picos obtidos foram denominados como: Ba-1, Ba-4, Ba-5, Ba-6 e Ba-7 que correspondem com as fosfolipases isoladas: BaspPLA₂-I, MTX-I, MTX-II, MTX-III e MTX-IV, respectivamente.

3.4.1.3 Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Fenil-Sepharose

A fração ácida, denominada Ba-1 (~60 mg), contendo a enzima ácida de interesse, foi liofilizada, dissolvida em 1 mL de Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 contendo NaCl 4M, homogeneizada e centrifugada a 480 xg por 2 minutos. Posteriormente, foi aplicada na coluna de interação hidrofóbica Fenil-Sepharose “High Sub”, previamente equilibrada a temperatura ambiente com o mesmo tampão a temperatura ambiente, utilizando fluxo de 1,5 mL/min, coletando-se frações de 3 mL/tubo, com gradiente decrescente e descontínuo de NaCl (4 a 0 M) em tampão

Tris-HCl 0,05 M pH 7,4, até água destilada pura. Todos os passos da purificação foram realizados em temperatura ambiente ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$) e os picos obtidos foram monitorados em espectrofotômetro GENESYS em 280nm e através da atividade enzimática. O grau de pureza da PLA₂ ácida isolada denominada, de BaspPLA₂-I, foi avaliada por SDS-PAGE e as amostras foram liofilizadas e usadas para caracterização farmacológica e bioquímica.

3.5 Sistemas de ultrafiltração

As frações eluídas das cromatografias foram submetidas a um sistema de ultrafiltração AMICON, utilizando membrana de separação para PM < 3.000, monitoradas em espectrofotômetro GENESYS a 280nm, sendo concentradas, liofilizadas e armazenadas a 4°C.

3.6 Caracterizações Bioquímicas

3.6.1 Determinação quantitativa de proteínas

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

3.6.2 Determinação do Peso Molecular (SDS-PAGE a 12%)

Foi realizada segundo metodologia descrita por Laemmli (1970), com modificações conforme descrito a seguir. O gel de 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 1%. O gel de concentração a 6% em acrilamida foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e SDS 0,1%. Amostras de proteínas e peçonha bruta foram dissolvidas em tampão fosfato em salina (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 β-mercaptoetanol que foi adicionado ao tampão de amostra a 3,5%.

Após a corrida eletroforética, que durou aproximadamente 2 h 30 min a 95 V e 15 mA, 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%. Em seguida, o gel foi documentado em “scanner”, e embebido em gelatina incolor a 5% para secagem entre papéis celofanes. Os padrões de pesos moleculares utilizados 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 β -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 do peso molecular do padrão.

3.6.3 Focalização Isoelétrica

O pI foi determinado por focalização isoeletrica, segundo o método descrito por Vesterebeg (1972), com a colaboração da Prof.Dr. Eliane C. Arantes, FCFRP-USP. Preparo do gel: O gel foi preparado a 5% em poliacrilamida (bis-acrilamida: acrilamida 0,8:30), composto por 10% de sacarose, 1% (v/v) de *buffalyte*, 0,17% (v/v) de TEMED e 0,075% (m/v) de persulfato de amônio. A polimerização do gel foi realizada em placa de vidro de 12 x 14 cm com espessura de 0,14 cm. Logo, 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 750 V e 40 a 2 mA, e por 1 hora e 20 minutos em 150 V e 5 a 0 mA.

3.6.4 Determinação do peso molecular por Espectrometria de massa

As proteínas foram analisadas em um espectrômetro de massas do tipo eletrospray triplo-quadrúplo (Quattro II, Micromass, Manchester, UK) utilizando um injetor eletrospray do tipo *nanoflow* e contendo um capilar de sílica fundida de 20 μ m de diâmetro interno, mantido a 2,8 kVolts, 40 V no cone de entrada e a uma temperatura de 100°C. Cada amostra foi infundida através de uma bomba tipo seringa (Harvard, Inc., USA) a um fluxo de 300 nL/min e os espectros de massa

foram coletados na forma de média de *scans* (15-30 *scans*) e processados com o software MassLynx v.3.3 (Micromass, Manchester, UK). A coleta de dados de massa utilizou varredura em MS1 (400-1500 u.m.a) obtendo-se assim a determinação da massa das proteínas.

3.6.5 Sequenciamento N-terminal

O sequenciamento da região N-terminal da proteína foi realizado num microsequenciador automático de proteína Procise modelo 491, (Perkin Elmer – Applied Biosystems, Foster City, CA), o qual utiliza o processo químico de sequenciamento por clivagem N-terminal, derivado do método desenvolvido por Edman conforme descrito por Gray (1972). Este processo tem como princípio a reativação específica do terminal amínico da proteína ou peptídeo, com conversão ao PITC e a remoção seletiva deste terminal amínico por uma ciclização intramolecular, enquanto que o restante da molécula permanece intacto. Cada ciclo da degradação remove sequencialmente um aminoácido do terminal amínico do polipeptídeo. Este processo cíclico que fornece parte da estrutura primária pode ser subdividido em quatro etapas: 1) acoplamento, 2) clivagem, 3) conversão, 4) identificação e quantificação, as quais são realizadas a cada ciclo.

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

2. **Clivagem:** O terminal amínico marcado com o PITC torna a ligação peptídica do aminoácido envolvido (do grupo amínico terminal da proteína) mais lábil e o tratamento ácido em meio anidro, TFA 100% (ácido orgânico forte), promove a quebra desta ligação peptídica, liberando o derivado de aminoácido aminoacilanilintiazolinona (ATZ-aminoácido) e deixando o restante do polipeptídeo intacto. A proteína remanescente é então deixada com um novo N-terminal, o qual será acoplado com o PITC no próximo ciclo. O ATZ-aminoácido a ser analisado será então extraído com solventes (cloreto de butila e acetato de etila) e transferido para o frasco de conversão, disponibilizando dessa forma a estrutura protéica para um novo acoplamento.
3. **Conversão:** O aminoácido aminoacilanilintiazolinona (ATZ-aminoácido) é instável e para aumentar sua estabilidade, uma alíquota da solução de TFA 25% é liberada no processo e, por hidrólise converte ATZ-aminoácido à feniltiocarbamil-derivado (PTC-aminoácido), o qual cicliza a uma forma mais estável, aminoacilfeniltio-hidantoína (PTH-aminoácido). Após a conversão, o solvente utilizado é evaporado, deixando o resíduo seco do PTH-aminoácido, que é então dissolvido em solução aquosa AcN 20% e transferido para o sistema HPLC. Este PTH-aminoácido é cromatograficamente separado, identificado por absorvância a 269nm e quantificado em um sistema de HPLC “microbore” (coluna PTH C₁₈, de 2,1x220mm com partículas de 5µm). Estas etapas são realizadas automaticamente pelo equipamento e repetidas a cada ciclo, obtendo-se a sequência de aminoácidos do polipeptídeo através de um sistema de coleta de dados do equipamento.
4. **Identificação e Quantificação:** A identificação e quantificação dos PTH-aminoácidos são realizadas com base em um padrão de 10 pmol de PTH-aminoácidos.

O sequenciamento N-terminal e a análise por espectrometria de massa foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Rodrigo G. Stábili, UNIR-RO. Os estudos de homologia sequencial foram realizados utilizando o banco de dados da SWISS-PROT (<http://www.expasy.ch/sprot/>).

3.7. Caracterização Enzimática

3.7.1. Atividade hemolítica indireta

Inicialmente, as frações selecionadas (Ba-I, Ba-4, Ba-5, Ba-6, Ba-7) da coluna de troca-iônica foram submetidas ao teste de atividade hemolítica indireta para determinar a presença ou ausência da atividade fosfolipásica. A atividade fosfolipásica foi testada pelo método de hemólise radial indireta, realizado em placas. Neste método, descrito por Gutiérrez *et al.* (1988), foi utilizada uma única modificação, a troca da agarose por ágar. O experimento consiste na elaboração de um gel (CaCl_2 0,01 M; gema de ovo 1:3 v/v PBS, pH 7,2; eritrócitos 1:3 v/v PBS; ágar bacteriológico 1% e azida de sódio 0,005%, sendo o volume final completado com PBS) que foi vertido em placas em temperatura de 45-50°C. Após a solidificação do gel foram feitos orifícios de tamanho uniforme (0,5 cm de diâmetro) e aplicadas nas amostras, em volume final de 40 µL, contendo peçonha bruta ou as proteínas isoladas, diluídas em PBS, em diferentes doses. Os géis contendo as amostras foram mantidos em estufa a 37°C por 12 horas. A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel era um indicativo de atividade fosfolipásica.

Realizaram-se determinações por quadruplicado, o PBS foi utilizado como controle negativo. A atividade fosfolipásica indireta foi definida como o diâmetro em milímetros da área de hemólise ($\text{mm} \pm \text{SD}$).

3.7.2. Atividade Fosfolipásica

A atividade fosfolipásica da peçonha bruta de *B. asper* do Panamá foi avaliada incubando 1.000 µL do substrato (emulsão de gema de ovo dissolvido em Tris (0,05M), CaCl_2 (10 mM) e Tritón X-100 (1%), pH 8,5) (GUTIÉRREZ *et al.*, 1986) junto a 100 µL da peçonha por 10 minutos a 37 °C. Diversas concentrações da peçonha bruta foram avaliadas. Os ácidos graxos liberados foram extraídos segundo a metodologia descrita por Dole (1956) utilizando-se uma mescla de: 2-propanol, heptano e ácido sulfúrico (numa proporção de 40 mL :10 mL : 55 mL / 100 mL). Uma alíquota de 2.000 µL da fração de heptano contendo os ácidos graxos liberados foi adicionada a 1.000 µL da mistura de titulação (azul timol) e valorizada

por titulação potenciométrica com NaOH (0,018N). Realizaram-se determinações por quadruplicado (média $\pm$ SD). O PBS foi utilizado como controle negativo.

Uma unidade de atividade fosfolipásica foi definida como os μ Eq de NaOH / mg de proteína/ min, necessários, nas condições de reação, para neutralizar 1 μ mol de ácido graxo por minuto.

3.7.3. Atividade Fosfolipásica sobre lipídeos fluorescentes

Fosfolipídeos fluorescentes em pó foram reconstituídos em 100 μ L de clorofórmio 100% e então distribuídos em tubos de vidro e depois secos sobre um baixo fluxo de N₂. Os lipídeos secos foram então dissolvidos em 150 mM de NaCl, sonificados quatro vezes a 4°C em intervalos de 1 min até que uma solução límpida seja obtida. Uma solução estoque de lipídeos de 1 mg/mL foi então preparada e utilizada nos testes.

A atividade fosfolipásica da enzima BaspPLA₂-I foi avaliada por intensidade de fluorescência, utilizando-se como acyl-NBD. Os testes foram realizados com um volume final de 3,0 mL em espectrômetro de fluorescência (Hitachi F450) em temperatura ambiente e cubetas para fluorescência. A excitação e emissão de comprimento de onda foram ajustadas para 460nm e 543nm, respectivamente. A reação padrão contém 50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, pH 7,5. Uma leitura prévia no tempo de 2 min foi realizada com todos os componentes exceto a enzima. Então a atividade enzimática foi iniciada através da adição da BaspPLA₂-I (1,5 μ g) produzindo uma segunda leitura após 12 min. Para corrigir traços de contaminações indesejáveis nas amostras, o tempo inicial de leitura foi subtraído da segunda leitura 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, tratando-a com hidróxido de sódio.

A determinação da atividade fosfolipásica sobre lipídeos fluorescentes foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. André L. Fuly, UERJ.

3.7.4. Atividade Proteolítica sobre a Fibrina

O ensaio de atividade fibrinolítica foi realizado de acordo com o método descrito por Morimoto *et al.*, (1991), Maruyama *et al.*, (1992) e Sugiki *et al.*, (1995), incubando-se diferentes doses da peçonha bruta de *B. asper* em placas de Petri contendo fibrina. Primeiramente preparou-se uma solução de fibrinogênio bovino (0,6%, p/v) em tampão borato 0,01 M, pH 7,8 contendo H_3BO_3 0,2 M, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,05 M e NaCl $5 \cdot 10^{-4}$ M. A solução de fibrinogênio bovino foi coagulada com 500 μL de uma solução contendo trombina bovina (2 U/mL). As placas contendo o coágulo foram mantidas a 4°C e após 30 min, com auxílio de uma ponteira, um número adequado de pequenas cavidades (5 mm de diâmetro) foi feito sobre o coágulo de fibrina. Para determinar a atividade fibrinolítica, alíquotas de 30 μL contendo diferentes doses da peçonha bruta foram adicionadas em cada cavidade e em seguida a placa foi incubada por 18 h a 37 °C. A atividade fibrinolítica foi avaliada visualmente e quantificada através dos halos de lises produzidos, comparando-se com um controle positivo (veneno bruto de *Bothrops jararacussu*) e um controle negativo (PBS). A atividade fibrinolítica foi expressa como o diâmetro em milímetros da área de lise.

A determinação da atividade proteolítica sobre a fibrina foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Masugi Marujama, Universidade de Miyazaki, Japão.

3.8. Caracterização Toxicológica

3.8.1. Atividade Miotóxica

Grupos de 4 camundongos machos Swiss (18-22 g) foram injetados via intramuscular (i.m.) no músculo gastrocnêmio direito com diferentes doses da peçonha bruta de *B. asper* (25 μg) ou das proteínas isoladas (50 μg), dissolvidos em 50 μL de PBS. Os controles negativos receberam somente PBS. Três horas depois, o sangue dos camundongos foi coletado, por corte na extremidade da cauda, em capilares heparinizados e imediatamente centrifugados por 20 min a 1.530 $\times g$.

A atividade da enzima creatina cinase foi determinada utilizando-se 4 μL de plasma incubados com 1,0 mL de reativo do kit CK-UV cinético (Bioclin) dissolvido em água destilada, por 3 min a 37°C, através de leituras em espectrofotômetro a 340 nm. A atividade foi expressa em unidades/litro (média $\pm$ SD). Uma unidade

consiste no resultado da fosforilação de um nanomol (nmol) de creatina por minuto (SOARES, 2000).

3.8. 2. Análises Histopatológicas em Microscopia Óptica:

Para as análises histopatológicas em microscopia óptica, os fragmentos retirados do músculo gastrocnêmio direito dos camundongos, injetados com as amostras como descrito anteriormente, foram retirados e congelados em nitrogênio líquido. Realizou-se cortes transversais com 8 µm de espessura em criostato (-20°C) e submetidos a coloração hematoxilina e eosina (HE) para a avaliação da morfologia geral das fibras musculares.

As análises histopatológicas do músculo gastrocnêmio dos camundongos foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Veridiana M. Rodrigues, UFU.

3.8.3. Indução de edema em camundongos

Em grupos de 04 camundongos *Swiss* machos (18-22g) foram injetados via intradérmica (i.d.) na região subplantar da pata direita posterior com 50 µL de soluções contendo diferentes doses da amostra (peçonha bruta de *B. asper*) dissolvidas em PBS. A mensuração da espessura das patas foi realizada antes da inoculação das amostras (tempo 0h). Os controles negativos foram realizados com injeções de 50 µL de PBS por animal, os quais foram também medidos. Em seguida, realizou-se a mensuração das patas em diferentes intervalos de tempo após as administrações (30, 60, 90, 120, 150 e 180 min). De cada valor obtido foram subtraídos os valores inicialmente aferidos no tempo 0h e os valores obtidos a partir de animais inoculados somente com PBS. Os valores obtidos para os animais que receberam injeção da peçonha bruta foram considerados como 100% de edema induzido. O aumento do volume nas patas dos camundongos foi medido com um paquímetro de baixa pressão 0,01 mm (Mytutoyo, Japão) e expresso em porcentagem de edema induzido (SOARES *et al.*, 2000).

3.8.4. Atividade hemorrágica

Foi injetado em grupos de 4 camundongos machos Swiss (18-22 g) por via intradérmica (i.d.) 50 µL/camundongo de soluções contendo diferentes doses da amostra (peçonha bruta de *B. asper*) dissolvidas em PBS segundo a metodologia descrita por Gutiérrez *et al.* (1985). Após duas horas, os animais foram sacrificados e as peles removidas para avaliação da atividade hemorrágica. A hemorragia foi avaliada medindo-se os diâmetros do halo hemorrágico formado na pele dos animais (mm $\pm$ SD). Com os valores das médias dos diâmetros determinou-se a dose hemorrágica mínima que correspondeu à quantidade da peçonha, respectivamente, que produz um halo hemorrágico de 10 mm de diâmetro (GUTIÉRREZ *et al.*, 1985).

3.8.5. Letalidade

A letalidade da peçonha bruta de *B. asper* foi avaliada segundo a metodologia descrita por (Gutiérrez *et al.*, 1986) após a injeção intraperitoneal (i.p.) de diferentes concentrações da amostra em grupos de 4 camundongos. Todos os animais foram observados durante um período de 48 horas.

Os valores da dose letal média (LD₅₀) foram calculados segundo o método de Trevors (1986).

3.8.6. Atividade Coagulante

A atividade coagulante foi avaliada segundo a metodologia descrita por Gené *et al.* (1989) utilizando plasma humano citratado (500 µL) fornecido pelo Hemocentro da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP. Para o ensaio, o plasma foi descongelado e mantido incubado a 37 °C.

Diferentes doses da amostra (peçonha bruta de *B. asper*) dissolvidas em 100 µL de PBS, pH 7,4, foram então incubadas por 5 min com o plasma. Seguidamente à incubação, foi adicionado a cada tubo 100 µL de CaCl₂ (0,25M) e misturado suavemente. A formação do coágulo foi observada e os tempos cronometrados.

Realizaram-se determinações por quadruplicado e foi utilizado PBS como controle negativo.

3.9. Caracterização Farmacológica

3.9.1 Atividade antitumoral

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

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

As células foram cultivadas em frascos apropriados e mantidas em fase exponencial de crescimento. As culturas de células aderentes foram então destacadas com tripsina a 0,05% e 0,02% de EDTA em PBS livre de cálcio e lavadas com meio RPMI em centrífuga a 800xg/15min a 10°C. A concentração de células foi determinada em câmara de Neubauer, ajustada e colocada em placas de cultura de 96 poços para que cada poço contivesse 1×10^5 células. Depois de 24 horas de cultivo, o meio foi removido e, diferentes concentrações das amostras de proteína e droga controle foram adicionadas e incubadas por 24h. Após este período 20µL de MTT a 10mg/mL foram adicionados aos poços e incubados por mais 4 horas para que as células viáveis incorporassem o tetrazolium. Finalmente, 50µL de dodecil sulfato de sódio a 20% foram adicionados em cada poço, no intuito de dissolver os cristais de formazan formados no meio de cultura, sendo as placas novamente incubadas a 37°C por 12 horas no escuro. Foi utilizada como controle positivo a droga metotrexato (MTX). Os controles negativo (célula e meio RPMI) e branco (meio RPMI) também foram mensurados.

Após este período, foram feitas as leituras das placas em espectrofotômetro de microplacas no comprimento de onda de 570 nm. A taxa de citotoxicidade foi

calculada com a seguinte equação: % de toxicidade dos compostos = $1 - \frac{\text{absorbância do poço tratado}}{\text{absorbância do poço controle}} \times 100$.

3.9.2. Atividade citotóxica

3.9.2.1. Atividade bactericida

A atividade bactericida das MTX-I e MTX-II foram avaliadas sobre bactérias *E. coli* de acordo com a metodologia descrita por HEMAN-ACKAH, (1975), modificada por SOARES *et al.* (2000). Para o ensaio, 4×10^5 células/mL da linhagem de *E. coli* (ATCC 29648) foram incubadas com diferentes concentrações da MTX-I e MTX-II por 30 min à 37°C em tampão PBS, pH 7,4, contendo peptona 1% e as bactérias sobreviventes foram contadas pela técnica de diluição em placas, segundo a metodologia descrita por Stábeli *et al.* (2006). A análise da atividade bactericida da MTX-I e MTX-II foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Marta C. Monteiro, UFPA.

3.9.2.2. Atividade fungicida

Para a avaliação da atividade fungicida foram utilizadas cepas de *Cândida albicans* (ATCC 24433). Cerca de 4×10^5 UFC foram incubadas em tampão PBS, pH 7,4, contendo peptona 1% com diferentes concentrações das MTX-I e MTX-II a 37°C por períodos de 30 minutos e os fungos sobreviventes foram contados pela técnica de diluição em placas, segundo a metodologia descrita por Stábeli *et al.* (2006). A análise da atividade fungicida das MTX-I e MTX-II foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Marta C. Monteiro, UFPA.

3.9.2.3. Atividade citotóxica em células J774A

A viabilidade das células foi avaliada por exclusão do azul de tripano de uma monocapa de células J774A. 1. cultivadas no meio RPMI-1640 contendo penicilina (100 µg/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e L-glutamina (2mM). Uma alíquota de células foi retirada do meio de cultivo e sua concentração foi determinada e ajustada a 2×10^5 células/80 µL. Logo as células foram colocadas em frascos plásticos e incubadas com 20 µL de diferentes concentrações (1,5; 3 e 6 µg/mL) de MTX-I, MTX-II e MTX-III diluídas em RPMI (controle), por 1 hora a 37°C em uma atmosfera

umidificada (5% CO₂). Logo, 20 µL do azul de tripano 0.1% foi adicionado a 100 µL da suspensão de macrófagos J774A.1. A relação de células viáveis foi determinada em 100 células contadas na câmara de Neubauer's. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis.

A análise do efeito citotóxico das MTX-I e MTX-II em células J774A foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Juliana Zuliani, UNIR.

3.9.2.4. Avaliação do metabolismo oxidativo de células J774A.1

A avaliação do metabolismo oxidativo de células J774A.1 foi realizada mediante o teste colorimétrico de redução do tetrazólio nitroazul (NBT). Neste teste a geração de superóxido através da redução do tetrazólio nitroazul (NBT) um composto lipossolúvel amarelo que quando transformado em insolúvel é azul em sua forma reduzida (MADHAVI e DAS, 1994). Neste teste a concentração de células J774A.1 foi ajustada a 2×10^5 /100 µL, outra alíquota de 100 µL de células foi incubada com 100 µL de RPMI contendo NBT 0.1% (controle), outra alíquota de células foi incubada com 100 µL de uma suspensão de partículas de zymosan (2×10^6 /100 µL) diluída em RPMI contendo NBT 0.1% (controle positivo). Foram preparadas suspensões de células nas mesmas condições anteriores e foram agregadas a elas 100 µL de diferentes concentrações de MTX-I ou II ou III (1.5, 3 e 6 µg/ml), diluídas em RPMI contendo NBT 0.1% e incubadas por 1 h a 37° C em uma atmosfera umedecida (CO₂ de 5%). Ao final do período de incubação os tubos de cultura foram centrifugados por 30 segundos a 4.500 xg e as células foram lavadas duas vezes com PBS morno. O NBT depositado dentro das células reduziu-se e foi dissolvido, primeiramente adicionando 120 µL de KOH 2M para solubilizar as membranas celulares e então adicionando 140 µL de DMSO para dissolver o formazan (azul escuro) com agitação ligeira por 10 min a temperatura ambiente (25±3 °C). A solução contendo o NBT dissolvido foi transferida para uma placa de 96 poços e foi feita a leitura de sua absorvância em um leitor de microplaca a 620 nm. Os resultados foram expressos como a absorvância obtida de cada leitura. A análise da avaliação do metabolismo oxidativo de células J774A.1 foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Juliana Zuliani, UNIR.

3.9.2.5. Avaliação da atividade fagocítica de células J774A.1 de zimosan não opsonizado

Lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro foram revestidas com 2×10^5 células J774A. 1., colocadas em 24 placas e incubadas por 2h a 37°C em uma atmosfera de CO₂ ao 5% até se aderir as lamínulas. Depois da incubação as lamínulas foram lavadas com PBS pH 7,2 e as células não aderidas foram removidas. A monocapa de células aderidas foi incubada por 1 h a 37 °C em RPMI suplementado com penicilina (100 µg/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e L-glutamina (2 mM) em uma atmosfera de CO₂ ao 5% e desafiadas então com RPMI (controle) e com 6 µg/mL das amostras (MTX-I, MTX-II e MTX-III) diluídas em RPMI (6 µg/mL). Depois de lavada em PBS frio a monocapa foi incubada por 1 h a 37 °C e CO₂ ao 5% com zimosan não opsonizado. As partículas não aderidas foram removidas depois da lavagem com PBS. As células foram fixadas com glutaraldeído 2.5% por 15 min a temperatura ambiente e logo as lamínulas foram montadas em lâminas porta-objeto e a fagocitose observada e avaliada em microscopia de contraste de fase. Em cada determinação foram contados 200 macrófagos, aqueles que continham 3 ou más partículas internalizadas foram considerados positivos por fagocitose (ZULIANI *et al.*, 2005b). Os resultados foram expressos como a porcentagem de células positivas por fagocitose.

As partículas de zimosan, obtidas da parede celular de fungos, foram suspensas em PBS até fornecer uma concentração de 3 mg/mL. Logo, a solução de zimosan foi sonicada por 15 min e a quantidade total de partículas foi determinada em uma câmara de Neubauer. A relação de zimosan por macrófago foi de 1:10.

A análise da avaliação da atividade fagocítica de células J774A. 1 de zimosan não opsonizado foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Juliana Zuliani, UNIR.

3.9.2.6. Efeitos em plaquetas

O sangue foi coletado da artéria central da orelha de coelhos sadios usando citrato de sódio (0,31 % w/v, concentração final), como anticoagulante. O sangue foi centrifugado a 350xg por 12 minutos em tubos plásticos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e denominado plasma rico em plaquetas (PRP). O plasma

pobre em plaquetas (PPP) foi obtido após centrifugação do sangue a 1370 xg por 5 minutos, também a temperatura ambiente. Plaquetas lavadas (WRP) foram obtidas, na presença de 5 mM EDTA, a partir do PRP centrifugado a 1,370 x g por 15 min em temperatura ambiente. O pellet de plaquetas formado foi ressuspensionado em tampão Tyrode, pH 6,5 tomando-se cuidado para não formar espuma, sendo novamente centrifugado a 1,370xg por 15 minutos. Foram feitas mais 2 lavagens com este mesmo tampão e finalmente as plaquetas foram ressuspensas em tampão Tyrode, pH 7,5. A suspensão de plaquetas (WRP) foi mantida a temperatura ambiente até o momento dos ensaios. A suspensão de plaquetas foi ajustada para $3-4 \times 10^5$ plaquetas/L. Os testes de agregação plaquetária foram realizados a 37°C em cubetas de vidro siliconizadas com alíquotas de 250 µL de PRP ou WRP, mantidas sob constante agitação (aproximadamente 11.000 xg) por 2 minutos antes da adição de qualquer indutor. A agregação era monitorada fotometricamente em um “Whole Blood Lumi-Aggregometer” (Chrono-log Corp.), acoplado a um registrador de canais. Para os ensaios em WRP foram testadas várias concentrações da enzima isolada BaspPLA₂-I na presença de 1 mM CaCl₂ (concentração final) e também do agonista (ADP ou colágeno). Experimentos controle foram feitos na presença somente dos agonistas 100% de agregação plaquetária foi obtido com concentrações submáximas dos agonistas enquanto que 0 % de agregação plaquetária foi obtido pela variação de transmitância do WRP ou PRP sozinho. O efeito inibitório da PLA₂ na agregação plaquetária foi expresso como a diferença em percentual da resposta máxima obtida na presença da PLA₂ em comparação com o valor obtido no controle.

3.10. Análise dos Resultados

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 $0,1 < p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterizações bioquímicas e toxicológicas da peçonha

No SDS-PAGE da peçonha de *B. asper* do Panamá foram visíveis 15 bandas, das quais 4 bandas: 3, 6, 7 e 8 foram fortemente coloridas, 5 bandas: 1, 2, 13, 14 e 15 foram moderadamente coloridas e 6 bandas: 4, 5, 9, 10, 11 e 12 ligeiramente coloridas (Fig. 13A).

A focalização isoelétrica permitiu visualizar bandas protéicas básicas e acídicas na peçonha (Fig. 13B).

A avaliação de algumas atividades enzimáticas na peçonha permitiu identificar nela uma forte atividade fosfolipásica, quando avaliada por métodos titrimétricos (Fig. 14) e por hemólise indireta (Fig.15).

Determinou-se na peçonha uma atividade fosfolipase A₂ média de $27,2 \pm 0,45$ mEq/mg.min numa relação p/v de peçonha de 20 µg/100µL (Tabela 3) e uma dose hemolítica mínima de $7,2 \pm 0,01$ mg (Tabela 3).

Foi avaliada a atividade proteolítica da peçonha sobre fibrina (Fig. 16). A curva dose resposta (Fig. 16A) indica a presença de uma atividade fibrinolítica dose dependente, sendo a dose fibrinolítica mínima de 0,5 mg (Tabela 3).

A peçonha apresentou atividade hemorrágica dose – dependente (Fig. 17A) com uma dose hemorrágica mínima de $1,2 \pm 0,2$ mg (Tabela 3).

Quando avaliada a atividade miotóxica da peçonha (Fig. 18A) observou-se uma resposta dose-dependente com aumento significativo na atividade da creatina cinase, determinando-se a dose miotóxica mínima em 10 ± 1 mg da peçonha (Tabela 3). A análise histopatológica com microscopia de luz, das seções do músculo gastrocnêmio dos camundongos 24h depois da injeção da peçonha permitiu observar uma extensa mionecrose e hemorragia nas fibras musculares (Fig.18B).

A peçonha foi capaz de induzir a formação de edema nos camundongos injetados (Fig, 19), determinando-se a dose mínima indutora de edema em $1 \pm 0,1$ mg (Tabela 3).

A peçonha apresentou uma dose coagulante mínima de $3,5 \pm 0,05$ mg (Tabela 3) e uma LD₅₀ de 3,1 µg/mg.

Figura 13. SDS-PAGE e Focalização isoelétrica da peçonha de *B. asper*. (A) SDS-PAGE a 12%. Amostras: 1- PM- padrão de massa molecular; 2- Peçonha *B. asper* (10 μ g). Inicialmente foram visíveis 15 bandas, 4 bandas: 3, 6, 7 e 8 foram fortemente coloridas, 5 bandas: 1, 2, 13, 14 e 15 foram moderadamente coloridas e 6 bandas: 4, 5, 9, 10, 11 e 12 ligeiramente coloridas, 2- Peçonha *B. asper* (20 μ g); (B) Focalização Isoelétrica. Amostras: 1- Peçonha *B. asper* (10 μ g), 2- lentil lectina; 3- mioglobina. A focalização isoelétrica permitiu visualizar bandas protéicas básicas e ácidas na peçonha.

Figura 14. Determinação da atividade PLA₂ da peçonha de *B. asper* do Panamá pelo método de Dole (1956). Os resultados são expressos pela média $\pm$ S.D. em $\mu\text{Eq} / \text{mg} / \text{min}$ ($n=4$).

Figura 15. Determinação da atividade fosfolipásica da peçonha de *Bothrops asper* do Panamá pelo método de hemólise radial indireta, realizado em placas como é descrito por Gutiérrez *et al.* (1988). (A) Curva dose – resposta da atividade hemolítica indireta da peçonha de *B. asper*. A atividade fosfolipásica é expressa em mm. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ S.D. ($n=4$). (B) Placa de hemólise radial indireta contendo diferentes concentrações da peçonha de *B. asper* (0.1 e 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e o controle negativo (PBS).

Figura 16. Atividade proteolítica da peçonha de *Bothrops asper* do Panamá sobre a fibrina de acordo com o método descrito por Morimoto *et al.*, (1991) com modificações de Maruyama *et al.*, (1992) e Sugiki *et al.*, (1995). (A) Curva dose – resposta da atividade fibrinolítica. Os resultados são expressos em mm (n=4). (B) Placa de atividade fibrinolítica contendo 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ da peçonha de *B. asper* e o controle negativo (PBS).

Figura 17. Atividade hemorrágica da peçonha de *Bothrops asper* do Panamá segundo a metodologia descrita por Gutiérrez *et al.* (1985). (A) Curva dose – resposta da atividade hemorrágica. Os resultados são expressos em mm pela média $\pm$ S.D. (n=4). (B) Seção da pele de camundongo com lesão hemorrágica causada por $1,2 \pm 0,2$ µg da peçonha.

Figura 18. Atividade miotóxica da peçonha de *Bothrops asper* do Panamá. (A) Curva dose – resposta da atividade miotóxica expressa em unidades/litro (U/L) pela média $\pm$ S.D. ($n=4$). Análise histopatológica com microscopia de luz das seções do músculo gastrocnêmio dos camundongos 24h depois da injeção da peçonha de *B. asper*. (B) Controle negativo (PBS, 50 μ L), (C) Controle positivo (peçonha de *B. asper*, 25 μ g), observa-se necrose e infiltrado inflamatório nas fibras musculares.

Figura 19. Curvas dose – tempo dependente da atividade edematizante da peçonha de *Bothrops asper* do Panamá. Os resultados foram expressos em porcentagem de edema induzido (SOARES *et al.*, 2000) pela média $\pm$ S.D. (n=4).

Tabela 3. Atividades Tóxicas induzidas pela peçonha de *B. asper* do Panamá.

Efeito	Atividade
Letalidade (LD ₅₀ ; µg/mg) ^a	3,1
Indutor de Edema (DEM; mg)	1 $\pm$ 0,1
Hemorragica (MHD, mg)	1,2 $\pm$ 0,2
Coagulante (MCD; mg) ^b	3,5 $\pm$ 0,05
Fibrinolítica (MFD; mg) ^{ab}	0,5
Hemólise indireta (MHeD; mg) ^b	7,2 $\pm$ 0,01
Fosfolipase A ₂ (mEq/mg.min) ^b	27,2 $\pm$ 0,45
Miotóxica (MMD, mg)	10 $\pm$ 1

^a Exceto a letalidade e a atividade fibrinolítica onde os resultados foram apresentados pela média, todos os outros resultados foram apresentados pela média $\pm$ S.D.

^b Todas as determinações foram feitas em quadruplicata (n=4).

4.2 Isolamento e Caracterização Bioquímica

As fosfolipases A_2 básicas miotóxicas de *Bothrops asper* do Panamá foram obtidas em bom grau de pureza em apenas uma etapa cromatográfica em uma coluna contendo resina CM-Sepharose (Fig. 20A). Observa-se que os picos Ba-4 a Ba-7 representam as miotoxinas denominadas de MTX-I, III, IV e II, respectivamente.

Enquanto que, para o isolamento da PLA_2 ácida foi necessário um segundo passo cromatográfico, aplicando-se a fração Ba-1 em uma coluna de interação hidrofóbica Fenil-Sepharose (Fig. 20B). O último pico eluído nesta cromatografia apresentou alta atividade enzimática e bom grau de pureza, sendo denominada de Basp PLA_2 -I.

Todas as frações, obtidas nos dois passos cromatográficos, eluídas em altas concentrações de sal foram submetidas a um processo de ultrafiltração em sistema AMICON, utilizando membrana de separação para PM 3.000, obtendo desta forma, soluções de proteínas livres de sal podendo ser submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, dosagem de proteínas entre outros ensaios.

As enzimas isoladas foram avaliadas quanto ao seu grau de pureza em eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), na presença e ausência de agentes redutores (Fig. 21A). Observou-se o bom grau de pureza das enzimas, sendo que na presença de agentes redutores, as PLA_2 s apresentaram-se na forma monomérica com massa molecular ~14.000 daltons. Na ausência de agentes redutores, observou-se a formação de dímero (M_r ~ 28 kDa) em solução para todas as enzimas, como exemplificado para a Basp PLA_2 -I (Fig. 21A).

A análise das PLA_2 s por espectrometria de massa confirmou o bom grau de pureza das proteínas e a massa molecular dos monômeros ao redor de 14.000 daltons (Fig. 22).

A determinação do ponto isoelétrico demonstrou pIs entre 8,1 e 8,3 para as MTXs e pI ácido de 4,6 para a isoforma Basp PLA_2 -I (Fig. 22B). Estes dados estão de acordo com a ordem de eluição das proteínas em coluna trocadora de cátions, sendo eluídas inicialmente as moléculas carregadas negativamente.

Foi determinada a sequência N-terminal para as enzimas isoladas, demonstrando que a MTX-I e III são PLA₂s básicas com o resíduo de ácido aspártico na posição 49 (Asp49), enquanto que a MTX-II e IV são PLA₂s básicas contendo um resíduo de lisina na mesma posição (Lys49) (Fig. 23), tornando-se cataliticamente inativas ou de atividade enzimática residual (SOARES *et al.*, 2004). A BaspPLA₂-I é uma enzima ácida contendo o resíduo Asp49 (Fig.24).

A comparação da sequência N-terminal de MTX-I, MTX-III e MTX-II, MTX-IV mostrou similaridade com as PLA₂s miotóxicas I e III e PLA₂s miotóxicas II e IV isoladas de *B. asper* da Costa Rica, respectivamente (Fig.24). O múltiplo alinhamento das sequências de MTX-I, II, III e IV com as PLA₂s miotóxicas da peçonha do gênero *Bothrops* da Costa Rica *Bothrops* PLA₂s (Fig.24A) mostrou aminoácidos altamente conservados, tais como os resíduos de cisteína envolvidos na formação de pontes dissulfeto.

A sequência N-terminal de BaspPLA₂-I mostrou similaridade com as sequências de outras PLA₂s Asp49 acídicas das peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* (Fig.24B).

Figura 20. Isolamento de Fosfolipases A₂ da peçonha do *Bothrops asper*. (A) Cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose equilibrada com tampão AMBIC 0,05 M pH 8.0 com gradiente de concentração até 1 M à temperatura ambiente. Amostra: 300 mg da peçonha bruta de *B. asper*. Condições: fluxo de 1,5 mL/min, coletando-se frações de 3,5 mL/tubo. (B) Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Fenil-Sepharose equilibrada em tampão Tris HCl 0,05 M pH 7,4+ NaCl 4 M com gradiente decrescente e descontínuo de NaCl (4 a 0 M). Amostra: 60 mg da fração Ba-1, nas mesmas condições anteriores.

Figura 21. SDS-PAGE e Focalização isoeletrica de toxinas de *B. asper*. (A) SDS-PAGE a 12%. Amostras: PM- Padrão de Massa Molecular; 1- BaspPLA2-I (10 μ g); 2-BaspPLA2-I (20 μ g); 3- MTX-I (20 μ g); 4- MTX-II (20 μ g); 5- MTX-III (20 μ g); 6- MTX-IV (20 μ g); 7- Veneno *B. asper* (20 μ g); 8- BaspPLA2-I sem agente redutor; 9- BaspPLA2-I com agente redutor (15 μ g). (B) Focalização Isoelétrica. Amostras: 1- BaspPLA2-I (10 μ g); 2- MTX-I (10 μ g); 3- MTX-II (10 μ g); 4- MTX-III (10 μ g); 5- MTX-IV (20 μ g).

Figura 22. Análise de espectro de massa das fosfolipases A_2 isoladas: MTX-I, $Mr = 14.156$, MTX-II, $Mr = 14.249$, MTX-III, $Mr = 14.253$ e BaspPLA₂-I = 14.246. Amostra de MTX-IV não suficiente para a determinação.

4.3 Caracterizações enzimática, toxicológica e farmacológica

As fosfolipases A₂ isoladas foram submetidas ao ensaio de atividade fosfolipásica (hemólise indireta). Observou-se que somente as MTX-I, MTX-III e a BaspPLA₂-I apresentaram atividade enzimática (Fig. 24 e Fig. 28), sendo que a mais ativa de todas foi a isoforma ácida, a qual foi melhor caracterizada. A BaspPLA₂-I apresentou atividade enzimática dose-tempo dependente (Fig. 28A) e também demonstrou maior atividade específica sobre fosfolipídeos do tipo fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilglicerol (PG) do que sobre fosfatidiletanol (PE) e ácido fosfatídico (PA) (Fig. 28B).

Do mesmo jeito que a peçonha bruta as PLA₂s básicas isoladas foram capazes de induzir miotoxicidade (Fig. 25A). Enquanto que a isoforma ácida, a BaspPLA₂-I, não induziu aumento significativo de CK (Fig. 25A), mostrando-se não miotóxica. A miotoxicidade foi confirmada pela análise histopatológica do músculo gastrocnêmio direito de camundongos injetados com o veneno de *B. asper* e com as PLA₂s isoladas (Fig. 25B). O veneno bruto induziu extensa mionecrose e hemorragia (Fig. 25B), sendo que as miotoxinas básicas induziram somente mionecrose e migração de infiltrados leucocitários (Fig. 25D e 25E). Observou-se, novamente, que a PLA₂ ácida não induziu nenhuma necrose das fibras musculares semelhante ao controle injetado somente com PBS (Fig. 25B).

A avaliação da atividade citotóxica de MTX-I e MTX-II (100 µg) sobre células tumorais de Jurkat mostrou um 70% de efeito citotóxico (Fig. 26A). Também observou-se atividade bactericida contra *E. coli* (Fig. 26C) e antifúngica contra *C. albicans* (Fig. 26B).

A viabilidade de macrófagos J774A.1 não sofreu alterações após estas células terem sido incubadas por 60 minutos com 6 µg/µL de MTX-II, MTX-III e MTX-IV (Fig. 27A).

Quando os macrófagos foram incubados com RPMI apresentaram uma média de fagocitose de $16.5 \pm 0.5\%$ (Fig. 27B). Quando incubados com 6 µg/mL de MTX-II, MTX-III e MTX-IV a média de fagocitose foi de $30.6 \pm 0.6\%$, $29.3 \pm 5.5\%$ e $36.5 \pm 2.5\%$, respectivamente (Fig. 27B). Os macrófagos incubados com RPMI tiveram uma produção de superóxido de 0.316 ± 0.05 D.O., e incubados com RPMI com zimosan não opsonizado (control positivo)

tiveram uma produção de superóxido de 0.455 ± 0.1 D.O., o qual foi uma produção de superóxido significativamente maior que a produzida pelos controles (RPMI) (Fig. 27B). Macrófagos incubados com MTX-II e MTX-III, 3 e $6 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, induziram uma produção significativa de O_2^- pelos macrófagos J774A.1. Nos outros estudos realizados, MTX-II e MTX-III não afetaram a produção de O_2^- . A incubação com 3 e $6 \mu\text{g/mL}$ de MTX-IV induziram uma produção significativa de superóxido pelas células J774A.1. (Fig. 27B).

Somente a PLA_2 ácida de *B. asper* isolada neste trabalho, apresentou atividade inibitória da agregação plaquetária (Fig. 29). As funções plaquetárias podem ser avaliadas através de testes *in vitro* de agregação plaquetária. A Basp PLA_2 -I induziu inibição da agregação plaquetária (Fig. 29) de forma dose-dependente promovida por ADP ou colágeno.

Figura 24. Determinação da atividade fosfolipásica de toxinas básicas isoladas de *Bothrops asper* do Panamá pelo método de hemólise radial indireta, realizado em placas como é descrito por Gutiérrez *et al.* (1988). (A) Curva dose – resposta da atividade hemolítica indireta de toxinas básicas isoladas da peçonha de *B. asper*. A atividade fosfolipásica é expressa em mm. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ S.D. (n=4). (B) Placa de hemólise radial indireta contendo diferentes concentrações de toxinas básicas isoladas da peçonha de *B. asper* (0.1 e 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e o controle negativo (PBS).

Figura 25. Atividade miotóxica de toxinas isoladas da peçonha de *Bothrops asper* do Panamá. (A) Curva dose – resposta da atividade miotóxica expressa em unidades/litro (U/L) pela média $\pm$ S.D. (n=4). Análise histopatológica com microscopia de luz das seções do músculo gastrocnêmio dos camundongos 24h depois da injeção da peçonha de *B. asper*. (B) Controle negativo (PBS, 50 μ L), C) Controle positivo (peçonha de *B. asper*, 25 μ g), observa-se necrose e infiltrado inflamatório nas fibras musculares. D) MTX-I e III (50 μ g) e MTX-II e MTX-IV (50 μ g) observa-se necrose e infiltração inflamatório na fibra muscular.

Figura 26. Atividade citotóxica das mitotoxinas básicas isoladas da peçonha de *B. asper* do Panamá. A) Efeito de MTX-I e MTX-II na atividade antitumoral sobre a linhagem de células cancerosas JURKAT B) atividade fungicida sobre *C. albicans* e C) atividade bactericida sobre *E. coli*. Os resultados representam a média $\pm$ S. D. de 3 experimentos independentes.

Figura 27. Efeito de MTX-II, MTX-III e MTX-IV na fagocitose. (A) Produção de O₂⁻ (B) por macrófagos J774A.1. A fagocitose de partículas não opsonizadas de zimosan foi determinada por microscopia de contraste de fase. Macrófagos J774A.1 foram incubados com 6 µg/mL de MTX-II, MTX-III e MTX-IV ou RPMI (controle) durante 60 min antes da adição de partículas de zimosan não opsonizadas. Os resultados representam a média ± S.D. de 3 experimentos independentes. **P*<0.05 comparado com o controle, # *P*< 0.05 comparado com o controle positivo (ANOVA).

Figura 28. Atividade fosfolipásica de BaspPLA₂-I. A) Curva dose – dependente de atividade fosfolipásica de BaspPLA₂-I determinada pelo método de hemólise radial indireta. B) Atividade enzimática sobre fosfolipídeos fluorescentes da BaspPLA₂-I (1,5 μg). Fosfolipídeos: PC, fosfatidilcolina; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanol; PA, ácido fosfatídico. Os resultados foram expressos como a média ± S.D. (n=3).

Figura 29. Efeito inibitório de BASP-I-PLA₂ na agregação plaquetária. BASP-I-PLA₂ (2–40 mg/mL) foi preincubada a 37 °C por 2 min sob a agitação com plaquetas e logo a agregação foi iniciada com adição de A) ADP e colágeno. Os resultados foram expressos como a média ± S.D. (n=3).

Figura 30. Atividade fosfolipásica de Basp-PLA₂-I (0,1μg) dependente de A) pH, B) temperatura, C) tempo de incubação e D) concentração da enzima. Os resultados foram expressos como a média ± S.D. (n=4).

Figura 31. Atividade fosfolipásica de Basp-PLA₂-I (0,1μg) dependente de A) íons, B) cátions,C) íons Mn. Os resultados foram expressos como a média ± S.D. (n=4).

Figura 32. Atividade fosfolipásica de Basp-PLA₂-I (0,1μg) dependente de A) DPB, B) Inibidores. Os resultados foram expressos como a média ± S.D. (n=4).

5. Discussão

Neste trabalho, desmascarou-se bioquímica e toxicologicamente a peçonha bruta de *B. asper* do Panamá e foram isoladas e caracterizadas bioquímica, funcional e estruturalmente quatro fosfolipases básicas denominadas MTX-I, MTX-II, MTX-III e MTX-IV e a primeira fosfolipase A₂ ácida isolada a partir da peçonha da serpente *Bothrops asper* do Panamá, denominada BaspPLA₂-I.

O perfil eletroforético da peçonha em SDS-PAGE apresenta 15 bandas protéicas das quais algumas delas encontram-se entre 16 e 90 kDa (Fig. 13A). A focalização isoeletrica evidenciou a presença de componentes tanto ácidos como básicos (Fig. 13B).

A peçonha induz hemorragia, edema, miotoxicidade, apresenta atividade coagulante e fibrinolítica *in vitro*, além da letalidade também apresenta atividade fosfolipásica evidenciada por testes titrimétricos e de hemólise indireta. (Tabela 3).

O perfil toxicológico da peçonha da *B. asper* do Panamá é qualitativamente similar ao previamente descrito para *B. asper* da Costa Rica (GUTIÉRREZ *et al.*, 1980; GUTIÉRREZ e CHAVES, 1980) e da Guatemala (SARAIVA *et al.*, 2001), apesar de existir variações quantitativas em seus efeitos. Mesmo não tendo publicações a respeito dos envenenamentos ofídicos causados por picadas de *B. asper* no Panamá, as observações clínicas mostram que a patofisiologia do envenenamento é similar ao causado pelas picadas desta espécie na Costa Rica e Guatemala.

A natureza e as propriedades biológicas dos componentes da peçonha são particulares para cada espécie (ASSAKURA *et al.*, 1992), e sua concentração pode variar intraespécies em função de região geográfica, da idade do espécime, sexo, condições naturais, tamanho e susceptibilidade da presa pela peçonha (SEIGEL *et al.*, 1985; CHIPPAUX *et al.*, 1991; FERREIRA *et al.*, 1992). Estas variações intra específicas na composição da peçonha têm evidentes implicações na clínica e na terapêutica das vítimas do envenenamento por picadas de serpentes, assim como na replicabilidade dos resultados obtidos nos estudos toxinológicos e na produção de antisoros (WÜSTER *et al.*, 1999; SASSA, 1999).

Apesar da variabilidade na composição da peçonha, todas as serpentes peçonhentas ou não peçonhentas apresentam em suas secreções as fosfolipases A₂. As fosfolipases A₂ isoladas das peçonhas de serpentes exibem significantes similaridades em sua estrutura tridimensional, embora demonstrem diferentes

propriedades farmacológicas o que torna intrigantes os mecanismos de ação e a sua relação estrutura-função, fazendo do estudo destas proteínas uma ferramenta importante na descoberta de novos compostos de elevado potencial biotecnológico e de modelos moleculares de interesse médico-científico (BAILEY e WILCE, 2001). Dessa forma, se constituem ferramentas biológicas para o estudo dos processos fisiológicos e de intoxicação.

O método de isolamento de PLA₂s básicas proposto por Soares e colaboradores (1998), realizado em resina de CM-Sepharose, uma trocadora catiônica, em tampão AMBIC 0,05M pH8,0 em combinação com a cromatografia de interação hidrofóbica em Fenil-Sepharose mostrou-se adequado para a purificação das fosfolipases básicas denominadas MTX-I, MTX-II, MTX-III e MTX-IV e da primeira fosfolipase A₂ ácida denominada BaspPLA₂-I isoladas neste trabalho a partir da peçonha da serpente *Bothrops asper* do Panamá.

A pureza destas proteínas foi demonstrada por SDS-PAGE e focalização isoelétrica (Fig.21).

Várias peçonhas de serpentes já foram fracionadas utilizando procedimentos simplificados baseados em CM-Sepharose ou RP-HPLC: *Bothrops moojeni* (SOARES *et al.*, 2000a; STABÉLI *et al.*, 2006), *Bothrops pirajai* (SOARES *et al.*, 2001), *Bothrops jararacussu* (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2002), *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES *et al.*, 2004, 2007), entre outras.

Na cromatografia de troca iônica a separação é baseada na interação de moléculas carregadas presentes na fase móvel (tampão AMBIC pH 8,0) com a fase estacionária trocadora catiônica (resina de CM-Sepharose). Na presença de gradientes crescentes de concentração do tampão AMBIC (0,05-1M), ocorre o aumento progressivo da tendência de proteínas ligadas se dissociarem da matriz de troca iônica. O conhecimento do ponto isoelétrico (pI) de uma proteína, ou seja, o valor de pH no qual a sua carga total é nula, é de grande importância neste método de separação. Dessa forma, a PLA₂ ácida de interesse é eluída nos primeiros picos seguida pelas fosfolipases básicas, conforme Figura 20.

A determinação do ponto isoelétrico para BaspPLA₂-I foi de 4,6 e para MTX-I, MTX-II, MTX-III, MTX-IV o pI ficou entre 8,1 -8, 3 (Fig. 21), estes resultados obtidos estão de acordo com a ordem de eluição das proteínas na coluna trocadora de cátions associada ao tampão AMBIC pH 8,0, sendo eluídas inicialmente as moléculas carregadas negativamente em pH básico (Fig. 20A).

O perfil eletroforético em gel de poliacrilamida na presença de SDS das MTX-I, MTX-II, MTX-III, MTX-IV e BaspPLA₂-I (Fig. 21), revelou a tendência à formação de agregados multiméricos, o que corrobora a afirmação de que as PLA₂s possuem tendência a formarem agregados (ARNI e WARD, 1996). Em condições não redutoras, a fosfolipase A₂ ácida isolada se apresenta na forma dimérica o que explica sua massa molecular relativa em torno de 28.000, entretanto, quando está reduzida com β -mercaptoetanol a PLA₂ aparece com massa molecular relativa de 14.000, demonstrando sua estrutura homodimérica (Fig. 21). Os tratamentos com SDS e β -mercaptoetanol são eficientes na dissociação de agregados unidos por interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou pontes dissulfeto (WEBER e OSBORNE, 1969). Na eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% para proteínas ácidas sem agente desnaturante a proteína BaspPLA₂-I apresentou uma única banda, confirmando sua estrutura dimérica e sugerindo um alto grau de homogeneidade.

As PLA₂s são proteínas secretadas com Mr variando entre 14.000 e 18.000, estando entre as menores enzimas contendo aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos quando em cadeia única (DENNIS, 1994; SCHALOSKE e DENNIS, 2006).

Na década de 90, já foram realizados estudos sobre estruturas cristalográficas que mostram estruturas monoméricas (HOLAND *et al.*, 1990; SCOTT *et al.*, 1992), diméricas (BRUNIE *et al.*, 1985; ARNI *et al.*, 1995; DE AZEVEDO *et al.*, 1998) e triméricas (FREMONT *et al.*, 1993; SINGH *et al.*, 2005) de PLA₂ de serpentes.

A sequência da região N-terminal e a análise comparativa com outras PLA₂s das peçonhas de serpentes (Fig. 23) demonstraram a presença de resíduos altamente conservados constituintes da estrutura de α -hélice característica desta região, concordando com estudos que têm apontado a existência de determinadas posições extremamente conservadas nestas proteínas, juntamente a α -hélice N-terminal: a alça ligante de cálcio, a região de sítio ativo, a curta curva β e a hélice 3. Resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, presentes na porção N-terminal, parecem providenciar o acesso do substrato ao sítio catalítico participando da catálise (ARNI e WARD, 1996).

Além disso, tais resíduos poderiam ter uma grande importância estrutural se relacionando às diferentes atividades farmacológicas exercidas pelas PLA₂s. Vários

resíduos conservados que também possuem um papel crucial na expressão da atividade de PLA₂s cataliticamente ativas, como a sequência (D₄₂XCCXXHD₄₉) representante do sítio catalítico e o sítio de ligação ao cálcio (X₂₇CGXGG₃₂), fazem parte da sequência primária das svPLA₂s do grupo II (MURAKAMI e KUDO, 2004).

A maioria das fosfolipases A₂ isoladas das peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* descritas até o momento (Tabela 2), aproximadamente 59, 32 são proteínas básicas com pI variando entre 7 a 10, com a presença ou não de atividade catalítica (SELISTRE *et al.*, 1990; LOMONTE *et al.*, 1990; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; MANCUSO *et al.*, 1995; SOARES *et al.*, 2000; PONCE-SOTO *et al.*, 2007; HUANCAHUIRE-VEJA *et al.*, 2009) e 19 são ácidas com pI entre 4 e 5, dentre estas últimas, todas apresentam atividade catalítica (SELISTRE *et al.*, 1990; LOMONTE *et al.*, 1990; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; MANCUSO *et al.*, 1995). Um grande número de PLA₂s básicas têm sido purificadas por métodos bioquímicos convencionais, e caracterizadas, estrutural e funcionalmente.

Em 1995, Mancuso e colaboradores reportaram o isolamento, a caracterização química e funcionais parciais da piratoxina-I, uma PLA₂ Lys49 básica (pI: 8,9) a partir da peçonha de *Bothrops pirajai*. Toyama *et al.* (1995 e 1999) descreveram as sequências de aminoácidos das PLA₂s Lys49 básicas, piratoxina-I e II (pI = 9,0), e da PLA₂ Asp49 básica, piratoxina-III (pI: 8,5) da mesma peçonha. Em 2001, Soares e colaboradores contribuíram com estes estudos analisando a relação estrutura-função das piratoxinas-I e -III. No entanto, devido a baixa concentração nas peçonhas, pouco se conhece sobre o mecanismo de ação das PLA₂s ácidas em geral, altamente catalíticas, não tóxicas e indutoras de importantes efeitos farmacológicos dentre eles a inibição da agregação plaquetária e a hipotensão arterial. Estas proteínas se constituem importantes modelos no estudo da relação estrutura função entre fosfolipases A₂ tóxicas e não tóxicas das peçonhas de serpentes contribuindo para a elucidação estrutural dos determinantes de toxicidade.

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

A alquilação do resíduo de His48, altamente conservado, utilizando brometo de p-bromofenacila (BPB) induz a perda de atividade enzimática e redução dos efeitos tóxicos e farmacológicos das fosfolipases A₂ (SOARES e GIGLIO, 2003). Estudos de modificação química por BPB da piratoxina-III (PrTX-III) realizados por

Soares e colaboradores (2001) demonstraram a inibição das atividades enzimática, anticoagulante, miotóxica, citotoxicidade e edema quando comparadas com a enzima na forma nativa. Em estudos anteriores, a modificação do His48 de PLA₂s Asp49 ácidas de *Bothrops jararacussu*, BthA-I-PLA₂ e SIIISPIIB, de *Bothrops jararaca* (Bj-PLA₂) e de *Bothrops pauloensis* (Bp-PLA₂) inibiu quase completamente as atividades catalíticas e inibidora da agregação plaquetária, dentre outras específicas para cada caso (SERRANO *et al.*, 1999; KETELHUT *et al.*, 2003; ROBERTO *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2007). Conforme foi observado na realização dos ensaios biológicos, a alquilação por BPB de BaspPLA₂-I inibiu estas duas atividades (Fig. 32).

As PLA₂s Asp49 das peçonhas de serpentes são proteínas extremamente interessantes justamente pelo fato de apresentarem diversas atividades biológicas não relacionadas ao mecanismo catalítico típico destas enzimas. Kini e Evans (1989) propuseram um modelo de ação para as PLA₂s no qual sítios farmacológicos específicos, situados em diferentes partes destas enzimas, interagem com sítios alvos nos tecidos interferindo em diversos processos fisiológicos. Entretanto, apesar do grande número de estudos na área, pouco é conhecido em termos estruturais a respeito da localização precisa destes sítios.

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

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

trabalhos envolvendo a análise estrutural destas enzimas foram realizados. Nenhuma mudança conformacional foi observada na alquilação envolvendo a PLA₂ ácida de *Agkistrodon halys*, com exceção das modificações do sítio catalítico onde o resíduo de His48 está covalentemente ligado ao BPB (ZHAO *et al.*, 1998). Entretanto, sugere-se que a presença do íon Na⁺² no “loop” ligante de cálcio poderia impedir eventuais alterações estruturais provocadas pela alquilação por BPB (MAGRO, 2006).

Diferentemente, a estrutura da PLA₂ bovina modificada com BPB apresentou significativas mudanças conformacionais nos “loops” pancreáticos (resíduos 50 a 72) e no “loop” de ligação ao cálcio quando comparados com a enzima nativa (RENETSEDER *et al.*, 1988). Além disso, alterações significativas no “loop” ligante de cálcio, na β “-wing” e na C-terminal, regiões relacionadas a diversas atividades farmacológicas, foram encontradas na análise estrutural da BthA-I-PLA₂ complexada com BPB de *Bothrops jararacussu*.

Magro (2006) sugeriu que a ligação com BPB nesta enzima parece inibir indiretamente as atividades anticoagulantes, a agregação plaquetária e hipotensora indicando que o mecanismo de ação da fosfolipase A₂ parece envolver os sítios farmacológicos, e não somente a atividade catalítica intrínseca da proteína.

Adicionalmente, Marchi-Salvador (2008) realizando a elucidação estrutural da PLA₂s Lys49 (desprovidas de atividade catalítica) modificadas por BPB, PrTX-I-BPB de *Bothrops pirajai*, demonstrou uma alteração conformacional na região C-terminal (resíduos 115-133), e sugeriu que redução das atividades miotóxicas, citotóxicas e edematogênicas gerada pela modificação por BPB da His48 poderia ser atribuída a alteração observada na região C-terminal, referida como responsável por estas atividades, indicando que o mecanismo tóxico desta proteína não é exclusivo do sítio ativo.

Dessa forma, a caracterização proteômica e mais especificamente, novos estudos estruturais são necessários para o entendimento do mecanismo de inativação catalítico também como a inibição de efeitos tóxicos e farmacológicos por ação do BPB. Tais estudos auxiliariam no entendimento do mecanismo farmacológicos de PLA₂s, e poderiam ser de extrema utilidade para o desenho de novos fármacos com ação em variados processos patológicos.

No presente trabalho, a atividade PLA₂ da peçonha bruta (Fig. 14) foi determinada por titulação potenciométrica, um método que utiliza como substrato

uma emulsão aquosa de gema de ovo na presença de deoxicolato de sódio e cálcio (Dole, 1956). A atividade enzimática das PLA₂s isoladas foi determinada por atividade hemolítica indireta descrito por Gutiérrez *et al.* (1988). As PLA₂ básicas MTX-I, MTX-III e PLA₂ ácida BaspPLA₂-I de *B. asper* apresentaram elevada atividade enzimática (Fig. 24a e 28a) quando comparada com a MTX-II e MTX-IV PLA₂ Lys49 básicas do mesmo veneno. A atividade de PLA₂ ácida BaspPLA₂-I também foi determinada sobre fosfolipídeos fluorescentes, apresentando elevada atividade enzimática quando o fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol foram usados como substratos em comparação com fosfatidiletanol e ácido fosfatídico (Fig. 28). Os resultados obtidos estão de acordo com estudos anteriores envolvendo PLA₂s acídicas que apresentam uma maior atividade enzimática quando fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol foram usados como substratos (RODRIGUES *et al.*, 2007; SANTOS-FILHO *et al.*, 2008).

O processo de alquilação do resíduo de His48 através da pré-incubação da BaspPLA₂-I com BPB aboliu completamente tal atividade (Fig. 32). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com estudos anteriores envolvendo PLA₂s da peçonha de serpentes, nos quais PLA₂s Asp49 ácidas são cataliticamente mais ativas do que suas isoformas básicas. Além disso, a participação do resíduo de His48 na atividade catalítica também foi comprovada (ROSENBERG *et al.*, 1983; ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2002; CHIOATO e WARD, 2003).

O sítio catalítico das PLA₂s é formado pelos resíduos His48, Asp49, Tyr52, Tyr73 e Asp99. Os resíduos de Tyr52 e Tyr73 possuem a função de estabilizar o resíduo Asp99 (DUPUREUR *et al.*, 1992), que através do grupo COO⁻, estabiliza o anel imidazólico da His48 que torna-se positivamente carregado no estado de transição. Os oxigênios, O δ_1 e O δ_2 do resíduo Asp49, o oxigênio da carbonila do resíduo de Gly30, além do oxigênio do grupo fosfato, coordenam o íon cálcio que será responsável pela estabilização do oxiânion no estado intermediário, proporcionando uma melhor orientação do fosfolipídio.

A estabilidade estrutural e funcional de fosfolipases A₂ depende essencialmente de fatores como pH, temperatura e cofatores. Desta forma, para avaliar a estabilidade enzimática de BaspPLA₂-I, a enzima foi caracterizada através do teste de atividade fosfolipásica utilizando o método de hemólise radial indireta, sob diferentes condições de temperatura, de pH, de concentração enzimática, de íons e de inibidores (Fig. 30, 31 e 32). A atividade PLA₂ da BaspPLA₂-I se mostrou

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

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

A miotoxicidade foi avaliada neste trabalho através dos níveis de atividade da creatina cinase (CK) plasmática de animais injetados. A creatina cinase é uma enzima do metabolismo energético muscular que em casos de lesão celular é liberada e pode ser detectada no plasma, como um marcador. As quatro PLA₂s básicas isoladas induziram aumento da CK, enquanto a BaspPLA₂-I não induziu (Fig. 25A,B), se mostrando não miotóxica, corroborando os resultados anteriores nos quais PLA₂s ácidas, apesar de altamente catalíticas, não apresentam toxicidade experimental (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2002; ROBERTO *et al.*, 2004; MODESTO *et al.*, 2006), dissociando atividade catalítica e miotoxicidade.

A ação miotóxica de PLA₂s presentes em peçonhas de serpentes ocorre através da sua interação com a membrana sarcoplasmática o que acarreta uma desorganização dos componentes fosfolipídicos permitindo a saída de moléculas intracelulares como a creatina e a creatina cinase (GUTIÉRREZ *et al.*, 1989). As miotoxinas podem ou não apresentar atividade catalítica, ou seja, ser capaz de hidrolisar fosfolipídeos de gema de ovo. As cataliticamente ativas possuem um resíduo de aspartato na posição 49, responsável pela ligação ao cálcio, enquanto aquelas com pouca ou nenhuma atividade apresentam um resíduo de lisina nesta

mesma posição. Sendo assim, o mecanismo de ação envolvido na miotoxicidade parece estar dissociado da capacidade de catálise das PLA₂s.

Vários grupos de pesquisa através de métodos laboratoriais e até mesmo teóricos propõem diversas hipóteses buscando sítios farmacológicos específicos nestas enzimas. Uma região rica em resíduos de aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos junto a porção NH₂-terminal de PLA₂s miotóxicas parece estar envolvida com a lesão da célula muscular (KINI e EVANS, 1989; DÍAZ *et al.*, 1994). Um segmento também catiônico e hidrofóbico (resíduos 115 a 129) foi identificado em PLA₂s Lys49 como ligante de heparina na membrana celular e responsável pelo efeito miotóxico. Propondo que uma região positivamente carregada na superfície de enzimas miotóxicas poderia constituir um sítio miotóxico (CHIOATO e WARD, 2003).

Dessa forma, resíduos de aminoácidos comuns entre as PLA₂s básicas e ausentes nas PLA₂s ácidas parecem estar envolvidos com esta atividade miotóxica. Assim, a ausência de miotoxicidade apresentada pela BaspPLA₂-I pode estar relacionada à ausência destes resíduos.

A peçonha bruta e as MTX-I II, III e IV mostraram uma alta atividade miotóxica quando injetadas no músculo gastrocnêmio de camundongos (Fig. 18A e 25A). A análise histológica revelou uma drástica mionecrose e infiltração leucocitária induzida pelas miotoxinas (Fig. 18C e 25 B,C e D) quando comparadas com as células controle negativo (Fig. 25A).

Nossos resultados concordam com os resultados de Gutiérrez e Lomonte (1997) e sugerem que miotoxinas Lys49 MTX-II e MTX-IV podem afetar a membrana plasmática das fibras musculares esqueléticas sem hidrólise de fosfolipídios.

Esses resultados sugerem que, além do sítio catalítico, estas toxinas podem ter outras regiões moleculares que podem se unir e desorganizar a membrana plasmática da célula muscular esquelética (ROSENBERG, 1986).

Alguns componentes das peçonhas de serpentes têm efeitos citotóxicos nas células e as levam à morte por necroses e são responsáveis por outras respostas celulares diferentes da morte celular, mas que contribuem pelas alterações observadas nos tecidos. Os macrófagos são células especializadas do sistema imune que são responsáveis pela ingestão de células mortas e eliminação de diversos patógenos.

No teste da toxicidade das miotoxinas da *B. asper* em macrófagos J774A.1, foram realizados experimentos para examinar o efeito de 1 hora de incubação de

diferentes concentrações de MTX-II, MTX-III e MTX-IV na viabilidade de macrófagos. As 3 miotoxinas estudadas não afetaram a viabilidade dos macrófagos (Fig. 27A). Nossos resultados concordam com os resultados de Zuliani *et al.* (2005b) que indicam a baixa toxicidade de miotoxinas neste tipo de células.

Os macrófagos desempenham um rol central em alguns processos associados com a manutenção de tecidos, apresentação antigênica, inflamação e reparação de tecidos (NAITO, 1993). A fagocitose é um processo essencial para a defesa do hospedeiro, necessitando da coordenação de várias reações de sinalização, realizadas por fagócitos, alguns neutrófilos e macrófagos, para desencadear as respostas do hospedeiro e a inflamação. Este evento é iniciado depois do reconhecimento e união de ligando das partículas. Os receptores de reconhecimento encontram-se na superfície dos fagócitos (ADEREM e UNDERHILL, 1999).

Quando foi avaliado o efeito de MTX-II, MTX-III, MTX-IV e RPMI (controle) na fagocitose, via receptor do β -glucano de partículas de zimosan não opzonizadas por macrófagos da linhagem celular J774A.1, apresentou-se uma porcentagem de fagocitose de $16.5 \pm 0.5\%$. A incubação de macrófagos com $6 \mu\text{g/mL}$ de MTX-II, MTX-III, MTX-IV apresentou uma porcentagem de fagocitose de $30.6 \pm 0.6\%$, $29.3 \pm 5.5\%$ e $36.5 \pm 2.5\%$, respectivamente. Esses resultados evidenciam que as miotoxinas isoladas são hábeis para estimular a fagocitose em macrófagos J774A.1. de partículas de zimosan não opzonizadas (Fig. 27). Esses resultados concordam com observações prévias dos efeitos de moléculas similares na atividade fagocítica de partículas de zimosan não opzonizado por macrófagos (ZULIANI *et al.* 2005b). Além disso, esses resultados sugerem que a atividade catalítica não é essencial para o efeito observado, e argui pela hipótese que outras regiões na molécula, diferentes do sítio ativo, podem estar envolvidas nesse efeito.

Uma das respostas imediatas de macrófagos durante a fagocitose é a produção de potentes radicais livres, anion superóxido. O complexo enzimático primário responsável pela produção desta espécie oxigênio reativa é o complexo NADPH oxidasa.

Esta espécie reativa de oxigênio (ERO) é usada por fagócitos para eliminar os microorganismos ingeridos, sendo um componente do sistema imune inato (BABIOR, 1999; 2004; BABIOR *et al.*, 2002). Esta reação paralela a liberação de

uma variedade de mediadores inflamatórios que possuem um papel crucial na resposta de defesa do hospedeiro para matar microorganismos, pode também ser causa de dano nos tecidos circundantes (NAITO, 1993; BABIOR, 1999; 2004; FORMAN e TORRES, 2002).

A linhagem de macrófagos J774A.1 incubados com MTX-II, MTX-III e MTX-IV mostraram uma porcentagem de produção de superóxido de 0.316 ± 0.05 D.O., e J774A.1 incubados com RPMI com partículas de zimosan não opzonizadas (controle positivo), mostraram uma porcentagem de produção de superóxido de 0.455 ± 0.1 D.O (Fig. 27) o que resultou em uma produção elevada de superóxido. Esses dados sugerem que as miotoxinas induzem a produção de superóxido nos macrófagos J774A.1 e indica a capacidade destas toxinas para ativar estas células. Os resultados, também sugerem que a atividade catalítica não é importante para a produção de superóxido, e assim arguem para a hipótese que outras regiões moleculares distintas do sítio ativo podem estar envolvidas nesse efeito.

Assim, nossos resultados concordam com os resultados que têm mostrado um aumento na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), outra espécie reativa de oxigênio gerada pelo sistema NADPH-oxidase por macrófagos incubados com MT-II e MT-III da peçonha da *B. asper* da Costa Rica (ZULIANI et al., 2005b).

É importante ressaltar que a fagocitose mediada por receptores β -glucano e por receptores de manose e $Fc\gamma$ estão associados com a produção de moléculas proinflamatórias e microbidas, tais como ERO (ADEREM e UNDERHILL, 1999; HERRE et al., 2004; PARK, 2003). A liberação de ERO por células fagocíticas têm sido implicado na morte de microorganismos (JIANG et al., 1997), assim como no dano dos tecidos circundantes no hospedeiro (CLARK e KLEBANOFF, 1975).

Considerando que MT-II e MT-III isoladas da peçonha da *B. asper* da Costa Rica exibem uma ampla atividade citolítica e afetam uma grande variedade de cultivos celulares (BULTRÓN et al., 1993; LOMONTE et al., 1994a), nossos resultados sugerem um rol do O_2^- na citotoxicidade induzida por essas toxinas, uma hipótese que poderia ser encaminhada com o uso de agentes antioxidantes

Um grande número de PLA₂ isoladas de venenos de serpentes possuem atividade bactericida. A atividade bactericida de MTX-I e MTX-II foi avaliada sobre as linhagens *E. coli*. MTX-I e MTX-II retardaram o crescimento da cultura das linhagens de maneira dose-dependente quando incubada por 30 min. Em adição ao seu papel

letal sobre bactérias, MTX-I e MTX-II foi um efetivo agente fungicida sobre culturas de *C. albicans*.

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

A inflamação local é uma característica do envenenamento por serpentes das subfamílias Viperidae e Crotalidae (DENNIS, 1994). O edema local induzido por peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* parece ser mediado por substâncias vasoativas, como histamina e serotonina, além de prostaglandinas e quininas (GUTIÉRREZ *et al.*, 1986). A degranulação de mastócitos e consequente liberação de serotonina parecem ser os passos iniciais na formação de edema nas patas de camundongos injetados com peçonhas de serpentes. Além disso, substâncias lipídicas liberadas a partir da atividade catalítica de PLA₂s serviriam como precursores de mediadores pro-inflamatórios envolvidos no processo edematogênico.

A administração de 1±0.1 mg da peçonha bruta de *B. asper* via intradérmica subplantar foi capaz de induzir edema de 58%. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados anteriormente com peçonha bruta de *B. asper* da Costa Rica (GUTIÉRREZ *et al.* 1980)

Um grande número de substâncias que afetam o sistema hemostático estão presentes nas peçonhas de serpentes Viperidae e Crotalidae, incluindo proteínas anticoagulantes, procoagulantes, fibrinogênio(líticas), que atuam sobre a parede de vasos sanguíneos, que interferem na agregação plaquetária, que interagem com proteínas do plasma, possuindo um efeito difuso sobre o sistema cardiovascular (MARKLAND, 1998; DU *et al.*, 2006).

A PLA₂ ácida de *B. asper* isolada neste trabalho, apresentou efeito inibitório da agregação plaquetária. As plaquetas desempenham um papel essencial no sistema hemostático, pois além de participarem da formação de trombos contendo a lesão de vasos sanguíneos, contribuem com seus receptores de membrana que facilitam e amplificam a atividade localizada dos fatores da coagulação sanguínea (RUGGERI e MENDOLICCHIO, 2007).

As funções plaquetárias podem ser avaliadas através de testes *in vitro* de agregação plaquetária. Várias proteínas presentes em peçonhas de serpentes, dentre estas fosfolipases A_2 , desintegrinas, serinoproteases e lectinas do tipo C, modulam seletivamente a adesão ou ativação plaquetária por meio de um efeito específico em receptores e seus ligando (ZINGALI *et al.*, 1993; SERRANO *et al.*, 1995; FULY *et al.*, 1997; COELHO *et al.*, 1999).

De acordo com os efeitos sobre plaquetas, as PLA_2 s atuam através de pelo menos três mecanismo relacionados a sua atividade catalítica. Algumas PLA_2 s induzem agregação plaquetária por clivarem fosfolipídios presentes na membrana de plaquetas liberando ácido araquidônico e formando seus metabólitos, por exemplo o tromboxano A_2 . Outras PLA_2 s inibem a agregação plaquetária por clivarem estes subprodutos do ácido araquidônico. Além disso, existem PLA_2 s que induzem resposta bifásica, efeito pro-agregatório em baixas concentrações ou em tempos curtos de incubação e um efeito anti-agregante, em altas concentrações ou em longos períodos de incubação (FULY *et al.*, 1997). Os efeitos sobre plaquetas podem também ser independentes da catálise pelas PLA_2 s. Uma fosfolipase A_2 potente inibidora da agregação plaquetária isolada da serpente *Ophiophagus hannah* é parcialmente dependente da atividade enzimática, sendo o efeito anti-plaquetário mediado também por uma mudança no citoesqueleto plaquetário relacionada a um sítio alostérico localizado no “loop” pancreático da enzima (HUANG *et al.*, 1997).

A Basp PLA_2 -I também induziu inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (WRP) (Fig. 29) dose-dependente promovida por ADP ou colágeno, perdendo a atividade após modificação química com BPB (resultado não apresentado). Wang e colaboradores (1996) sugerem que a participação dos resíduos Phe20, Trp21 (curta hélice) e Phe113, Trp119 (C-terminal) de PLA_2 s no processo de inibição da agregação plaquetária. Em outros estudos envolvendo as PLA_2 s ácidas, a BE-I- PLA_2 , isolada de *Bothrops erythromelas*, a TJ- PLA_2 , de *Trimeresurus jerdonii* e a BthA-I- PLA_2 de *B. jararacussu* também apresentam efeito inibitório sobre a agregação plaquetária (LU *et al.*, 2002; ROBERTO *et al.*, 2004; DE MODESTO *et al.*, 2006).

Além dos resultados apresentados neste trabalho, voltados a desmascarar bioquímica e toxicologicamente a peçonha bruta de *B. asper* do Panamá e isolar suas principais fosfolipases A_2 envolvidas nas lesões tissulares e sistêmicas que

apresentam as vítimas envolvidas nos envenenamentos, se faz necessário a caracterização proteômica da peçonha e, mais especificamente, novos estudos estruturais, para o entendimento do mecanismo de ação, assim como do mecanismo de inibição de efeitos tóxicos e farmacológicos. Tais estudos auxiliariam no entendimento dos mecanismos farmacológicos de PLA₂s, e poderiam ser de extrema utilidade para a elaboração de novos fármacos com ação em diferentes processos fisiopatológicos, assim como poderão auxiliar na confirmação de hipóteses apresentadas neste trabalho.

6. CONCLUSÕES

1. O perfil toxicológico da peçonha da *B. asper* do Panamá é qualitativamente similar ao previamente descrito para *B. asper* da Costa Rica e da Guatemala, apesar de existir variações quantitativas em seus efeitos.
2. As fosfolipases A₂ básicas denominadas de (MTX-I a IV) e ácida (BaspPLA₂-I) foram eficientemente isoladas da peçonha da *Bothrops asper* do Panamá, utilizando-se duas etapas cromatográficas (CM-Sepharose e Fenil-Sepharose). Obtendo-se as proteínas ativas e em alto grau de pureza.
3. As enzimas demonstraram massa molecular de ~14.000 daltons para o monômero, sendo diméricas em solução na ausência de agentes redutores.
4. A análise da sequência N-terminal demonstrou que as MTX-I, MTX-III e BaspPLA₂-I pertencem à subclasse das fosfolipases A₂ Asp49 que são cataliticamente ativas, enquanto que, a MTX-II e MTX-IV são proteínas pertencentes à subclasse das PLA₂s Lys49 enzimaticamente inativas ou de atividade residual. A isoforma ácida, a BaspPLA₂-I, demonstrou maior atividade catalítica do que as PLA₂s básicas. Esta enzima foi mais ativa sobre substratos como fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol.
5. Somente as isoformas básicas induziram miotoxicidade *in vivo* em camundongos, juntamente com uma proeminente reação inflamatória detectada por meio dos infiltrados leucocitários e ativação de macrófagos para exercer atividade fagocítica e produção de superóxido. A MTX-II foi a que mostrou maior atividade citotóxica contra células tumorais JURKAT, *C. albicans* e *E. coli*.

6. Somente a isoforma ácida foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida tanto por ADP quanto por colágeno.
7. Este trabalho apresentou a primeira fosfolipase ácida BaspPLA₂-I isolada da peçonha de *B. asper* do Panamá, além disso, apresentou o isolamento de quatros fosfolipases básicas miotóxicas da mesma peçonha e que são similares as previamente isoladas das peçonhas de *B. asper* de Costa Rica.

7. Referências Bibliográficas

ADEREM, A., UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Ann Rev Immunol**, v. 17, p. 593-623, 1999.

ALAGÓN, A.C.; MOLINAR, R. R.; POSSANI, L. D.; FLETCHER, J. E.; CRONAN, J. Z. Venom from the Snake *Bothrops asper* Garman. **Biochem J**, v.185, p. 695-704. 1980.

ALAPE-GIRÓN, A.; SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FLORES-DÍAZ, M.; MADRIGAL, M.; SASA, M.; CALVETE J. J. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*. Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. **J Proteome Res**, v. 7, p. 3556–3571. 2008.

ALVAREZ, L.W.; ALVAREZ, W.; ASARO, W. F.; MICHEL H. V. Extraterrestrial Cause for the Cretaceous-Tertiary Extinction. **Science**, v. 208, p. 1095-1108, 1980

ANDRIÃO-ESCARSO, S.; SOARES, A. M; RODRIGUES, V. M.; ANGULO, Y.; DIAZ,C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, p. 755-763, 2000.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.; 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.

ANGULO, Y.; CHAVES, E.; ALAPE, A.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Isolation and characterization of a myotoxic phospholipase A₂ from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) schlegelii* from Costa Rica. **Arch Biochem Biophys**, v. 339, p. 260–6, 1997.

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

ÁNGULO, Y.; GUTIERREZ, J.M.; SOARES, AM; CHO, W. W.; LOMONTE, B. Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys 49 phospholipase A₂ homologues are reduced but not abolished, by a pH – induced dissociation. **Toxicon**, v. 46, p. 291-296, 2005

ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, doi:10.1016/j.toxicon.2008.12.014, 2008

ARAGÓN, F.; GUBENSEK, F. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. **Toxicon**, v. 19, p. 797-805, 1981.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Crystallization and preliminary diffraction data of bothropstoxin I isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v.33, p. 383-386, 1995.

ARNI, R.; WARD, R. J. Phospholipase A₂-a structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827-841, 1996.

ASSAKURA, M.T.; FURTADO, M.F.; MANDELBAUM, F. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Comp Biochem Physiol**, v. 102B, p. 727–32, 1992.

AZEVEDO, W.F.; WARD R. J.; CANDURI F.; SOARES A ; GIGLIO J.R. ; ARNI R. K. Crystal structure of piratoxin-I: a calcium-independent, myotoxic Phospholipase A₂-homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Toxicon**, v. 36, p. 1395-406, 1998.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464-1476, 1999.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase. **Curr Opin Immunol**, v. 16, p. 42-47, 2004.

BABIOR, B.M., Lambeth, J.D., Nauseef, W. The neutrophil NADPH oxidase. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 397, p. 342-344, 2002.

BAHNSON, B. J. Structure, function and interfacial allostereism in phospholipase A₂: Insight from the anion-assisted dimer. **Arch Biochem Biophys**, v, 433, p. 96-106, 2005.

BAILEY, P.; WILCE J. Venom as a source of useful biologically active molecules **Emergen. Med. Aus**, v. 13, p. 28-36, 2001.

BALAJI, M. The Roots of Ophidian Symbolism. **Ethos**, v. 6, p. 125-158, 1978

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

BOLAÑOS, R. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. **Am J Trop Med Hyg**, v. 21, p. 360–363, 1972.

BOLAÑOS, R. Serpientes, Venenos y Ofidismo en Centroamérica. Editora Universidad de Costa Rica, p.15-104, 1984.

BOGIN, O. Venom peptides and their mimetics as potential drugs. **Modulator**, v. 14, p. 14-20, 2005

BORTOLETO-BUGS, R.K.; NETO, A.A.; WARD, R.J. Activation of Ca^{2+} -independent membrane damaging activity in Lys49–phospholipase A_2 promoted by amphiphilic molecule. **Biochem Bioph Res Co**, v. 322, p. 364–372, 2004.

BRIGGS, J. C. Biogeography and plate tectonics. Elsevier Science, p. 2004,1987.

BRUNIE, S., BOLIN, J. GEWIRTH, D.; SIGLER, P. B. The refined crystal structure of dimeric phospholipase A_2 at 2.5 Å. Access to a shielded catalytic center. **J Biol Chem**, v. 260, p. 9742-49, 1985.

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

BULTRÓN, E.; THELESTAM, M.; GUTIÉRREZ J.M. Effects on cultured mammalian cells of myotoxin III, a phospholipase A_2 isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) venom. **Biochim Biophys Acta**, v. 1179, p. 253–259, 1993.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W.W. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Comstock Publishing Associates: Ithaca, NY, and London, 1032 p., 2004.

CHIOATO L.; WARD, R. J. 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.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, p. 1279-1303, 1991.

CHIPPAUX, J.P. Snake-bites: appraisal of the global situation, **Bull. World Bull. Health Organ**, v. 76, p. 515–524, 1998.

CHIPPAUX, J.P. The venom apparatus. In: J.P. CHIPPAUX Snake venoms and envenomations. Malabar (Florida): Krieger Publishing Company, p. 47–73, 2006.

CLARK, R.A.; KLEBANOFF, S.J. Neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity: role of the peroxidase system. **J Exp Med**, v.141, p. 1442-1447, 1975.

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

COGO, J.C.; LILLA, S.; SOUZA, G.H.M.F.; HYSLOP S.; DE NUCCI, G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) **Biochimie**, v. 88 , p. 1947–1959, 2006.

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

CUNDALL, D.; DEUFEL, A. Influence of the venom delivery system on intraoral prey transport in snakes. **Zool Anz**, v. 245, p. 193–210, 2006.

DALTRY, J.C.; WÜSTER, W.; THORPE, R. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v. 379, p. 537 – 540, 1996.

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.; CARRRILLO, D.B.; FIDELIO, G.D. A new phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedii* (yará chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**, v. 35, p. 1205-1215, 1997.

DE ALBUQUERQUE MODESTO, J.C.; 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

DE LIMA, D. C.; ALVAREZ, P.; DE FREITAS, C. C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, R.; DOS SANTOS, T.C; MENDES, L.; CASTRO, H. C. Review Snake venom: Any Clue for antibiotics and CAM? **eCAM**, v. 2, p. 39-47, 2005.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J Biol Chem**, v. 269, n. 18, 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.

DENNIS, EA. Phospholipase A₂ in eicosanoid generation. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161, p. S32-S35, 2000.

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

DESSEN, A. Phospholipase A₂ enzymes: structural diversity in lipid messenger metabolism. **Structure**, v. 8, p. R15-R22, 2000.

DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE B. Isolation and characterization of basic myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. **Arc Biochem Biophy**, v. 298, p. 135-142, 1992.

DIAZ C., ALAPE A., LOMONTE B., OLAMENDI T. AND GUTIERREZ J. M. Cleavage of the NH₂-terminal octapeptide of *Bothrops asper* myotoxic Lysine-49 phospholipase A₂ reduces its membrane-destabilizing effect. **Arc Biochem Biophy**, v. 312, p. 336-339, 1994.

DIAZ, C.; LOMONTE, B.; ZAMUDIO, F.; GUTIERREZ, 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

DIAZ, B.L.; ARM, J.P. Phospholipase A₂. **Prostag Leukotr Ess**, v.69, p. 87–97, 2003.

DOLE, V.P. A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. **J Clin Invest**, v. 35, p. 150-154, 1956.

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

DUFTON, M.J.; EAKER, D.; HIDER, R.C. Conformational properties of phospholipases A₂. **J Biochem**, v. 137, p. 537-544, 1983.

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

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

FAN, H.W.; CARDOSO, J.L. Clinical toxicology of snake bites in South America. In: J. MEIER, J. WHITE, editors. Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. Boca Raton (Florida): CRC Press, p. 667–688, 1995.

FENARD, D.; LAMBEAU, G.; VALENTIN, E.; LEFEBVRE, J. C.; LAZDUNSKI, M.; DOGLIO, A. Secreted phospholipases A₂, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. **J Clin Invest**, v. 104, p. 611-618, 1999.

FERLAN, I.; GUBENSEK, F. Phospholipases of *Bothrops asper* venom. **Period Biol**, v. 80, p. 31-36, 1978.

FERREIRA, M.L.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; FRANÇA, F.O.S.; CARDOSO, J.L.; MOTA, I. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon**, v. 30, p.1603–1608, 1992.

FRANCO, F.L. Origem e diversidade das Serpentes. In: J.L.C. CARDOSO, F.O.S. FRANCA, F.H. WEN, C.M.S. MÁLAQUE, V. HADDAD, (Eds.) *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica*. São Paulo: Sarvier, p. 22–41, 2009.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente Botrópico. In: J.L.C. CARDOSO, F.O.S. FRANCA, F.H. WEN, C.M.S. MÁLAQUE, V. HADDAD, (Eds.) *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica*. São Paulo: Sarvier, p. 81–95, 2009.

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.

FRY, B.G.; WÜSTER, W. Assembling an arsenal: Origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. **Mol Biol Evol**, v. 21, p. 870-883, 2004.

FRY, B.G.; SCHEIB, H.; VAN DER WEERD, L.; YOUNG, B.; MCNAUGHTAN, J.; RYAN RAMJAN, S.F.; VIDAL, N.; POELMANN, R. E.; NORMAN, J.A. Evolution of an arsenal structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). **Mol Cell Proteo**, v. 7, p. 215-246, 2008.

FORMAN, H.J., TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. **Am J Respir Crit Care Med**, v.166, S4-8, 2002.

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.; 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.

GAWADE, S.P. Therapeutic alternatives from venoms and toxins. **Indian J Pharmacol**, v. 39, p. 260-264, 2007.

GENÉ, J. A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; CERDAS, L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom **Toxicon**, v. 27, p. 841-848,1989.

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 neuwiedi* (yarára chica) from Argentina. **Toxicon**, v. 37, p. 1735–1746, 1999.

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

GRAY, W.R. Sequence analysis with dansyl chloride. **Method Enzymol Part B: Enzyme Structure**, v. 25, p. 333-344, 1972.

GUTIÉRREZ, J.M; CHAVES, F. Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. **Toxicon**, v. 18, p. 315-321, 1980.

GUTIÉRREZ, J.M.; ARROYO, O.; BOLAÑOS, R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. **Toxicon**, v. 18, p. 603-610, 1980.

GUTIÉRREZ, J.; OWNBY, C.; ODELL, G. Isolation of a miotoxin from *Bothrops asper* venom: Partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon**, v. 22, p.115-128, 1984.

GUTIÉRREZ, J. M.; GENÉ, A.; ROJAS, G.; CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 23, n. 6, p. 887-893, 1985.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; CERDAS, L. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. **Toxicon**, v. 24, p. 885-894, 1986a.

GUTIÉRREZ, J.M. ; LOMONTE, B.; CHAVES, F.; MORENO, E.; CERDAS, L. Pharmacological activities of a toxic phospholipase a isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Comp Biochem Physiol**, v. 84C, p. 159-164, 1986b.

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

GUTIÉRREZ, J. M. Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: J. MEIER, J. WHITE, editors. Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. Boca Raton (Florida): CRC Press, p. 645–665, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: R.M. KINI, Editor, Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism, Wiley, Chichester, p. 3, 1997.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. In: J.L.C. CARDOSO, F.O.S. FRANCA, F.H. WEN, C.M.S. MÁLAQUE, V. HADDAD, (Eds.) Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica. São Paulo: Sarvier, p. 366–375, 2009.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LEON, G.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; ANGULO, Y. Trends in Snakebite Envenomation Therapy: Scientific, Technological and Public Health Considerations **Curr Pharm Design**, v. 13, p. 2935-2950, 2007.

GUTIÉRREZ, J.M.; FAN, H.W.; SILVERA, C. L.M; ANGULO, Y. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: Report of a workshop. **Toxicon**, v. 53, n.6, p. 625-630, 2009a.

GUTIÉRREZ, J.M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, 2009b, doi:10.1016/j.toxicon.2009.01.039.

HEAD, J.J.; BLOCH, J.I.; HASTINGS, A.K.; BOURQUE, J.R.; CADENA, E. A.; HERRERA, F.A.; POLLY, D.; JARAMILLO C. Giant boid snake from the Palaeocene neotropics reveals hotter past equatorial temperatures. **Science**, v. 457, p. 715-717, 2009.

HEMAN-ACKAH, S. M. Microbial kinetics of drug action against gram-positive and gram-negative organism. II: effect of clindamycin on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **J Pharm Sci**, v. 64, p. 1612-1620, 1975.

HERRE, J.; MARSHALL, A.S.; CARON, E.; EDWARDS, A.D.; WILLIAMS, D.L.; SCHWEIGHOFFER, E.; TYBULEWICZ, V., SOUSA, C.R., GORDON, S., BROWN, G.D. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. **Blood**, v.104, 4038-4045, 2004.

HIGUCHI, D.A.; BARBOSA, C.M.V.; BINCOLETTTO, C.; CHAGAS, J.R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F.; PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; PESQUERO, J.L. Purification and partial characterization of two phospholipases A₂ from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, p. 319-328, 2007.

HOLLAND, D. R.; GLANCY, L.L.; MUCHMORE, S.W.; RYDE, T.J.; EINSPAHR, H.M.; FINZEL, B.C.; HEINRIKSON, R.L.; WATENPAUGH, K.D. The crystal structure of a Lysine 49 phospholipase A₂ from the venom of the cottonmouth snake at 2.0 Angstroms resolution. **J Biol Chem**, v. 265, p. 17649-17656, 1990.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 615-627, 1988.

HUANG, M.Z.; GOPALAKRISHNAKONE, P.F.; KINI, R. M. role of enzymatic activity in the antiplatelet effects of a phospholipase A₂ from *Ophiophagus hannah* snake venom. **Life Sciences**, v. 61, p. 2211-2217, 1997

HUANCAHUIRE-VEGA, S.; PONCE-SOTO, L.A.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S. Structural and functional characterization of brazilitoxins II and III (BbTX-II and -III), two myotoxins from the venom of *Bothrops brazili* snake. **Toxicon**, p.1-10, doi:10.1016/j.toxicon.2009.06.008, 2009

IBANEZ, R.; SOLIS, F. A. Las Serpientes de Panamá: Lista de Especies, Comentarios Taxonómicos y Bibliografía. **Scientia**, v. 6, p.27-52, 1993.

ITZHAKI, F. R.; GILL, D. M. A micro-biuret method for estimating proteins. **Anal Bioch**, v. 9, p. 401-410, 1964.

JIANG, X., WU, T.H., RUBIN, R.L. Bridging of neutrophil to target cells by opsonized zymosan enhances the cytotoxicity of neutrophil-produced H₂O₂. **J Immunol**, v. 159, p. 2468-2475, 1997.

JUTZY, D.A.; BIBER, S.H.; ELTON, N.W; LOWRY, E.C. A Clinical and Pathological Analysis of Snake Bites on the Panama Canal Zone. **Am J Trop Med Hyg**, v. 2, p. 129-141, 1953.

KAISER, I.; GUTIERREZ, J.; PLUMMER, D.; AIRD, S.; ODELI, G. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch Biochem Biophys**, v. 278, p. 319-325, 1990.

KANASHIRO, M.M.; ESCOCARD, R.C.M.; PETRETSKI, J.H.; PRATES, M.V.; ALVES, E.W.; MACHADO, O.L.T.; SILVA, W.D.; KIPNIS, T.L. Biochemical and biological properties of phospholipase A₂ from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochem Pharmacol**, v. 64, p. 1179-1186, 2002.

KARDONG, K.V. The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids and elapids. **Mem Inst Butantan**, v. 46, p.105-118, 1982.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A.R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A. Estimating the global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS. Med**, v. 5, p. 1591-1603, 2008,

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: KINI, S., (Ed.), *Venom phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, p. 1–28, 1997.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. Role of cationic residues in cytolytic activity: modification of lysine residues in the cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom and correlation between cytolytic and antiplatelet activity. **Toxicon**, v. 27, p. 613-635, 1989.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. Effects of phospholipase A₂ enzymes on platelet aggregation. In: R.M. KINI, Editor, *Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism*, Wiley, Chichester, p. 369–387, 1997.

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

KNIGHT, A. Bats, snakes and spiders, Oh my!” How aesthetic and negativistic attitudes, and other concepts predict support for species protection. **J Environ Psycho**, v. 28, p. 94-103, 2008.

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

KOH, D.C.I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Review Snake venom components and their applications in biomedicine Cellular and Molecular. **Life Sci**, v. 63, p. 3031-3041, 2006.

KORDIS, D.; KRIZAJ, I.; GUBENSEK, F. Functional diversification of animal toxins by adaptative evolution. In: A. Ménez, Editor, *Perspectives in Molecular Toxinology*, Wiley, New York, pp. 401–419, 2002.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. **Prostag Oth Lipid M**, v. 68–69, p. 3–58, 2002.

KUCH, U.; MEBS, D.; GUTIÉRREZ, J.M.; FREIRE, A. Biochemical and biological characterization of Ecuadorian pitviper venoms (genera *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrops* and *Lachesis*). **Toxicon**, v. 34, p. 714-717, 1996.

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.; GELB, M.H. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A₂. **Annu Rev Biochem**, v. 77, p. 495-520, 2008.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, p. 790-802, 2003.

LAURIN, M.; REISZ, R. R. A reevaluation of early amniote phylogeny. **Zool J Linn Soc Lond**, v. 113, p. 165-223, 1995.

LÔBO DE ARAÚJO, A.; RADVANYI, F.; BOM, C. Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom: Molecular and enzymatic properties. **Toxicon**, v. 32, p. 1069-1081, 1994.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 27, p.725-733, 1989.

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

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; RAMÍREZ, M.; DÍAZ, C. Neutralization of myotoxic phospholipases A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* by monoclonal antibodies. **Toxicon**, v.30, p.239-245, 1992.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a Lys-49 phospholipase A₂ of *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 32, n. 11, p. 1359-1369, 1994.

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

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

LUISELLI, L. Resource partitioning and interspecific competition in snakes: the search for general geographical and guild patterns. **Oikos**, v. 114, p.193-211, 2006a.

LUISELLI, L. Broad geographic, taxonomic and ecological patterns of interpopulation variation in the dietary habits of snakes. **A Web Ecol**, v. 6, p. 2-16, 2006b.

LYNCH, V. J. Inventing an arsenal: adaptive evolution and neofunctionalization of snake venom phospholipase A₂ genes. **BMC EVOL BIOL**, v. 7, p 10.1186/1471-2148-7-2, 2007.

MACHADO, O.L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R. Purification, physicochemical characterization and N-terminal-amino acid sequence of a phospholipase A₂ from *Bothrops jararaca* venom. **Braz J Med Biol Res**, v. 26, p. 163-166, 1993.

MACKESSY, S.P.; BAXTER, L. M. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. **Zool Anz**, v. 245, p. 147–159, 2006.

MADHAVI, N; DAS, V.N. Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the survival of vincristine sensitive and resistant human cervical carcinoma cells, *in vitro*. **Cancer Lett**, v.84, p. 31-41, 1994.

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

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

MANCUSO, L.C.; CORREA, M. M.; VIEIRA, C. A.; CUNHA, O. A. B.; LACHAT, J.J.; SELISTRE DE ARAUJO H. S.; OWNBY, C. L.; GIGLIO J. R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: Isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein **Toxicon**, v. 33, p. 615-626, 1995.

MARCHI-SALVADOR, D.P.; SILVEIRA, L.B.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of myotoxin-I, a Lys49-phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni*. **Acta Crystallogr**, v. 61, p. 882-884, 2005.

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

MARAGANORE, J. M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W.; KEZDY, F. J.; HEINRIKSONT, R. L.. A new class of phospholipases A₂ with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. **J. Biol. Chem**, v. 259, p. 13639-13843, 1984.

MARKLAND F.S. Snake Venoms and the Hemostatic System. **Toxicon**, v. 36, p. 1749-1800, 1998.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis **Toxicon**, v. 45, p. 1171-1181, 2005

MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H.; NAKAJIMA, N. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. **Toxicon**, v. 30 p. 1387–1397, 1992.

MAXEY, K.; MACDONALD, J. PLA₂. A short phospholipase review. **Cayman Curr**, v. 8, p. 1–5, 1998.

MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes. Sarvier Editoria, p. 42–70, 2009.

MELO, M.M.; PERREIRA, P.G.; DA SILVA, P.; DO LAGO, L.A.; VERÇOSA, D.; HABERMEHL, G.G. Envenenamento Botrópico. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 44, p. 59-79, 2004.

MÉNEZ, A.; STÖCKLIN, R.; MEBS, D. 'Venomics' or: The venomous systems genome project. **Toxicon**, v. 47, p. 255-259, 2006.

MÉIER, J. Venomous snakes. In: Stocker, K.F.; editor. Medical Use of Snake Venom Proteins. Boca Raton: CRC Press, Inc., p. 1-32, 1990.

MODESTO, J.C.A.; SPENCER, P.J.; FRITZEN, M.; VALENCA, 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 cell. **Biochem Pharmacol**, v. 72, p. 377–384, 2006.

MORA, J.; MORA, R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ J.M. Effects of *Bothrops asper* snake venom on lymphatic vessels: Insights into a hidden aspect of envenomation. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, p.1-10, 2008.

MORIMOTO, N.; SUMI, H.; TSUSHIMA, Y.; ETOU, Y.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H. Activated fibrinolytic enzymes in the synovial fluid during acute arthritis induced by urate crystal injection in dogs. **Blood Coag Fibrin**, v. 2, p. 609-616, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Meth**, v. 65, p. 55-63, 1983

MOURA-DA-SILVA. A.M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R.D. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, v. 29, p. 713-723, 1991.

MUNDKUR, B. The cult of the serpent in the Americas: Its Asian background. **Curr Anthropol**, v. 17, p. 429-455, 1976.

MUNDKUR, B. The roots of ofidian symbolism. **Ethos**, v. 6, p. 125-158, 1978.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Secretory phospholipase A₂. **Biol Pharm Bull**, v. 27, p. 1158-1164, 2004.

NAITO, M., 1993. Macrophage heterogeneity in development and differentiation. **Arch Histol Cytol**, v. 56, p. 331-351, 1993.

NISENBOM, H.E.; PERAZZO, J.C.; MONSERRAT, A.J.; VIDAL, J.C. Contribution of phospholipase A₂ to the lethal potency of *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. **Toxicon**, v. 24, p. 807–817, 1986a.

NISENBOM, H.E.; SEKI, C.; VIDAL, J.C. Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon**, v. 24, p. 259–272, 1986b.

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

OHNO, M.; MÉNEZ, R.; OGAWA, T.; DANSE, J.M.; SHIMOHIGASHI, Y.; FROMEN, C.; DUCANCEL, F.; ZINN-JUSTIN, S.; LE DU, M.H.; BOULAIN, J.-C.; TAMIYA, T.; MÉNEZ, A. Molecular Evolution of Snake Toxins: Is the Functional Diversity of Snake Toxins Associated with a Mechanism of Accelerated Evolution? **Prog Nucleic Acid Re**, v. 59, p. 307-364, 1997.

OHNO, M.; OGAWA, T.; ODA-UEDA, N.; CHIJIWA, T.; HATTORI, S. Accelerated and regional evolution of snake venom gland isozymes. In: A. Ménez, Editor, *Perspectives in Molecular Toxinology*, Wiley, New York, pp. 387–400, 2002.

OHNO, M.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; HATTORI, S. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A₂ from snake venom. **Toxicon**, v. 42, p.841-854, 2003

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.

OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; MESA, M.B.; DUQUE, E.; RODRÍGUEZ, O.; ARANGO, J.L.; GÓMEZ, F.; TORO, A.; CANO, F.; RODRÍGUEZ, L.M.; CARO, E.; MARTÍNEZ, J.; CORNEJO, W.; GÓMEZ, L.M.; URIBE, F. L.; CÁRDENAS, S.; NUÑEZ, V.; DÍAZ A. Complications of *Bothrops porthidium* and *Bothriechis* snakebites in Colombia: a clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a University Hospital. **Toxicon**, v. 40, p. 1107–1114, 2002.

PARK, J.B. Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages. **Exp Mol Med**, v. 35, p. 325-335, 2003.

PAUWELS, O.S.G; WALLACH, V.; DAVID, P. Global diversity of snakes (Serpentes: Reptilia) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p.599-605, 2008.

PONCE-SOTO, L.A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; RODRIGUES- SIMIONI, L.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus* **Biochim Biophys Acta**, v. 1770, p. 585–593, 2007.

POPE, K.O.; D'HONDT, S. L.; MARSHALL ,C. R. Meteorite impact and the mass extinction of species at the Cretaceous/Tertiary boundary. **PNAS**, v. 95, p. 11028-11029, 1998.

QUINTERO, A. El envenenamiento ofídico en Panamá: epidemiología, fisiopatología y evaluación por el Laboratorio Clínico. **Tecnológica**, v. 1, p. 24-27, 2000.

RAMOS, O.H.P; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Review. Snake venom metalloproteases structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 142, p. 328–346, 2006.

REICHL, A.P.; SERRANO, S.M.T.; ASSAKURA, M.T.; MANDELBAUM, F.R. Isolation and properties of a phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (Caissaca). **Mem Inst Butantan**, v. 51, p. 225–237, 1989.

RENETSEDER, R., BRUNIE, S., DIJKSTRA, B.W., DRENT, J., SIGLER, P.B. A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J Biol Chem**, v. 260, p.11627-11634, 1985.

RENETSEDER, R.; DIJKSTRA, B. W.; HUIZINGA, K.; KALK, K. H.; DRENT, J. Crystal structure of bovine pancreatic phospholipase A₂ covalently inhibited by p-bromo-phenacyl-bromide. **J Biol Chem**, v. 263, p.181-188, 1988.

RIGDEN, D. J.; HWA, L.W.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; POLIKARPOV, I. The structure of the D49 phospholipase A_2 piratoxin III from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: possible relationship to cooperative substrate binding. **Acta Crystallogr**, v. 59, p. 255-262, 2003.

ROBERTO, P.G.; KASHIMA, S. ; MARCUSSI, S.; PEREIRA, J.O.; ASTOLFI-FILHO, S.; NOMIZO, A.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.; SOARES, A. M.; FRANCA, S.C. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A_2 from *Bothrops jararacussu* venom. **Protein Journal**, v. 4, p. 273–285, 2004.

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 A_2 cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland. **Protein Expr Purif**, v. 37, p. 102–108, 2004.

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

RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R.S.; DE ARAÚJO, A. L.; MALTA-NETO, N.R; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; J. R. GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A_2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, p. 305–314, 2004.

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 A_2 from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, p. 153–165, 2007.

ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; GENÉ, J.A.; GÓMEZ, M.; CERDAS L. Neutralización de las actividades toxicas y enzimáticas de cuatro venenos de serpientes de Guatemala y Honduras por el antiveneno polivalente producido en Costa Rica. **Rev Biol Trop**, v. 35, pp. 67-69, 1987.

ROSENBERG, P.; CONDREA, E.; RAPUANO, B.E.; SOONS, K.R.; YANG, C.C. Dissociation of pharmacological and enzymatic activities of snake venom phospholipases A₂ by modification of carboxylate groups. **Biochem Pharmacol**, v. 32, p. 3525-3530, 1983.

RUCAVADO, A.; LOMONTE, B. Neutralization of myonecrosis, hemorrhage, and edema induced by *Bothrops asper* snake venom by homologous and heterologous pre-existing antibodies in mice. **Toxicon**, v.34, p. 567-577, 1996.

RUGGERI, Z. M.; MENDOLICCHIO, G. L. Adhesion mechanisms in platelet function. **Circ Res**, v. 100, p. 1673-1685, 2007.

RUSSELL, F.E.; WALTER, F.G.; BEY, T.A.; FERNANDEZ, M.C. Snakes and snakebite in Central America. **Toxicon**, v. 35, p. 1469-1522, 1997

SÁ, J.M.; CHIOATO, L.; FERREIRA, T.L.; OLIVEIRA, A.H.C.; RULLER, R.; GREENE, L.J.; WARD, R.J. Topology of the substrate – binding site of Lys49 – phospholipase A₂ influences Ca²⁺ - independent membrane damaging activity. **Biochem J**, v. 382, p. 191-198, 2005.

SARAVIA, P.; ROJAS, E.; ESCALANTE, T.; ARCE, V.; CHAVES, E.; VELÁSQUEZ, R.; LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M. The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. **Toxicon**, v. 39, p. 401-405, 2001.

SASSA, M. Diet and snake venom evolution: Can local selection alone explain intraspecific venom variation? **Toxicon**, v. 37, p. 249-252, 1999.

SASSA, M. Morphological variation in the lancehead pitviper *Bothrops asper* (Garman) (Serpentes: Viperidae) from Middle America. **Rev Biol Trop**, v. 50, p. 259-271, 2002.

SAVAGE, J.M. The amphibians and reptiles of Costa Rica. A Herpetofauna between two continents, between two seas. The University of Chicago Press, Chicago, p.934, 2002.

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.; 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.

SCOTT, D.L.; ACHARI, A.; VIDAL, J.C.; SIGLER, P.B. Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, **J Biol Chem**, v. 267, p. 22645–22657, 1992.

SEIGEL, R. A.; FITCH, H. S. Annual variation in reproduction in snakes in a fluctuating environment. **J Anim Ecol**, v. 54, p. 497-505, 1985.

SELISTRE, H.S.; QUEIROZ, L.S.; CUNHA, O.A.B.; DE SOUZA, G.E.P.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema inducing toxins from *Bothrops insularis* (Jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v.28, p. 261-273, 1990

SERRANO, S.M.; MENTELE, R.; FINK, E. Purification, characterization and aminoacid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 34, p. 7186-7193, 1995.

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

SERRANO, S. M. T.; SHANNON, J.D.; WANG DEYU, C. M.; CAMARGO A.; FOX J.W. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, p. 501–510, 2005.

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.

SINGH, G.; GOURINATH, S.; SARAVANAN, K.; SHARNA, S.; BHANUMATHI, S.; BETZEL, CH.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T.P. Sequence-induced trimerization of phospholipase A₂: structure of a trimeric isoform of PLA₂ from common krait (*Bungarus caeruleus*) at 2.5Å resolution. **Acta Crystallogr**, v. 61, p. 8-13, 2005.

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.

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

SOARES, A. M.; RODIGUES, 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 myotoxin i, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 373, p. 7-15, 2000.

SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 378, p. 201–209, 2000.

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 A₂ 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. Mn²⁺ ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ 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 A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, p. 855-868, 2003.

SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* Snake Venoms: Structure – Function Relationship. **Curr Org Chem**, v. 8, p. 1677-1690, 2004a.

SOARES, A.M.; SESTITO, W.P.; MARCUSSI, S.; STÁBELI, R.G.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H; CUNHA, O.A.B.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R. Alkylation of myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, p. 258–270, 2004b.

SOLÓRZANO, A. Snakes of Costa Rica. Editorial INBio, Costa Rica, p.792, 2004.

STÁBELI, R.G.; AMUI, S.F.; SANT'ANA, C.D. ; PIRES, M.G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M.C.; ROMÃO, P.R.T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO J.R.; FONTES M. R.M.; SOARES A. M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comp Biochem Phys C**, v. 142, p. 371–381, 2006.

SUGIKI, M.; MARUYAMA, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, D.G. Enhancement of plasma fibrinolysis in vitro by Jararhagin, the main haemorrhagic metalloproteinase in *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 33, p.1605-1617, 1995.

TSAI, I.H. Evolutionary reduction of enzymatic activities of snake venom phospholipases A₂. **Toxin Reviews**, v. 26, p.123 – 142, 2007.

TEIXEIRA, C.F.; PLANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 42, p. 947–962, 2003.

THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A.; GRIFFITHS, E. Report of WHO workshop on the standardization and control on antivenoms. **Toxicon**, v. 41, p. 541–557, 2003.

TREVORS, J.T. A basic program for estimating LD₅₀ values using the IBM-PC. **Bull. Environ Contam Toxicol**, v. 37, p. 18–26, 1986.

TISCHFIELD, J. A. Reassessment of the low molecular weight phospholipase A₂ gene family in mammals. **J Biol Chem**, v. 272, p. 17247-17250, 1997.

TOYAMA, M. H.; MANCUSO, L. C. ; GIGLIO, J. R. ; NOVELLO, J. C. ; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins I and II: Two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom: N-terminal. **Biochem Mol Biol Int**, v. 37, p. 1047-1055, 1995.

TOYAMA, M.H.; COSTA, P. D.; OLIVEIRA, B. ; GIGLIO, J.R. ;HOFLING, M.A.; MARANGONI, S. Purification and amino acid sequence of MP-III D49 phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA₂ and anticoagulant activities and high myotoxic activity. **J Protein Chem**, v. 18, n. 3, p. 371-378, 1999.

TRUMP, B.F. Characteristics and mechanisms of cell injury and cell death: the role of [Ca²⁺]_i. **Mar Environ Res**, v. 42, p. 57-63, 1996.

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. 11–19, 1972.

VIDAL, N.; HEDGES, S.B. The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes, and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. **Evolution**, v. 328, p. 1000-1008, 2005,

VITT, L.J; PIANKA, E.R, COOPER, JR W.E; SCHWENK K. History and the Global Ecology of Squamate Reptiles. **Am Nat**, v. 62, p. 44-60, 2003.

WAGNER, K.; BREZESINSKI, G. Phospholipases to recognize model membrane structures on a molecular length scale. **Curr Opin Colloid In**, v.13, p. 47–53, 2008.

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

WARD, R. J.; CHIOATO L.; OLIVEIRA, A.H.C.; RULLER R.; SÁ, J. M. Active site mutagenesis in a Lys49 Phospholipase A₂: biological and membrane disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochem J**, v. 362, p. 89-96, 2002.

WARELL, D. Epidemiology, clinical features and management of snake bites in Central and South America. In: J. Campbell; W.W. Lamar, eds. *Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Ithaca: Cornell University Press, p. 709–761, 2004.

WARELL, D. Venomous Animals. **Medicine**, v. 35, p. 659-662, 2007.

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphatepolyacrylamide gel electrophoresis. **J Biol Chem**, v. 224, p.4406-4412, 1969.

WEI, J.; WEI, X.; CHEN, Q.; HUANG, T.; QIAO, L.; WANG, W.; XIONG, Y.; HE, S. N49 phospholipase A₂, a unique subgroup of snake venom group II phospholipase A₂. **Biochim Biophys Acta**, v. 1760, p. 462-471, 2006.

WEN-HWA, L.; TOYAMA, M H; SOARES, A. M.; GIGLIO, J R.; MARANGONI, S.; POLIKARPOVA, I Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of piratoxin III, a D-49 phospholipase A₂ from the venom of *Bothrops pirajai*. **Acta Cryst**, v. 55, p. 1229- 1230, 1999.

WIENS, J. J; GRAHAM, C. H. Niche Conservatism: Integrating Evolution, Ecology, and Conservation Biology **Annu Rev Ecol Evol Syst**, v. 36 p. 519-539, 2005.

World Health Organization Progress in the Characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms. **WHO**, Geneva, 1981.

WÜSTER, W.; DALTRY, J.C.; THORPE, R.S. Can diet explain intraspecific venom variation? Reply to Sasa. **Toxicon**, v. 37, p. 253-258, 1999.

YANG, C.C. Chemistry and evolution of toxins in snake venoms. **Toxicon**, v.12, p. 1-43, 1974.

YU, B.Z.; BERG, O.G.; JAIN, M.K. The divalent cation is obligatory for the binding of ligands to the catalytic site of secreted PLA₂. **Biochemistry**, v. 32, p. 6484-6492, 1993

ZHAO, H.; TANG, L.; WANG, X.; ZHOU, Y.; ZHENGJIONG, LIN. Structure of a snake venom phospholipase A₂ modified by p-bromo-phenacyl-bromide. **Toxicon**, v. 36, p. 875-886, 1998.

ZHOU, Z.; JIANG, Z. Identifying snake species threatened by economic exploitation and international trade in China. **Biodiver Conser**, v. 14, p. 3525-3536, 2005.

ZINGALI, R.B.; JANDROT-PERRUS, M.; GUILLIN, M.C.; BON, C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, v. 32, p. 10794-10802, 1993.

ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; GUTIERREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 secretory phospholipases A₂: Role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45, p. 335-346, 2005a.

ZULIANI, J.P.; GUTIERREZ, J.M.; CASAIS, E.; SILVA, L.L.; SAMPAIO, S.C.; TEIXEIRA, C.F.P. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 Phospholipases A₂. **Toxicon**, v.46, p. 523-532, 2005b.