

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Isolamento, caracterização estrutural e bioquímica de uma nova fosfolipase A₂ presente na peçonha de *Lachesis muta rhombeata*”

Francielle Almeida Cordeiro

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 08/05/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2013

RESUMO

Cordeiro, F. A. **Isolamento, caracterização estrutural e bioquímica de uma nova fosfolipase A₂ presente na peçonha de *Lachesis muta rhombeata***. 112f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP, 2013.

As serpentes contêm em sua peçonha inúmeras substâncias que vão desde componentes inorgânicos até proteínas complexas com diferentes atividades sobre diversos sistemas fisiológicos. As serpentes do gênero *Lachesis* estão distribuídas na floresta tropical da América Central e do Sul, incluindo o Brasil. Entre as substâncias encontradas na peçonha dessas serpentes estão as fosfolipases A₂ (PLA₂), que constituem uma família de enzimas que catalisam a hidrólise da ligação éster sn-2 em glicerofosfolipídeos e exibem uma variedade de atividades fisiológicas e patológicas, incluindo neurotoxicidade pré e pós-sináptica. Elas induzem a formação de edema, afetam a agregação plaquetária, além de serem potentes promotores de inflamação. Os objetivos desse trabalho foram o isolamento, a caracterização estrutural e bioquímica de uma nova PLA₂ presente na peçonha de *Lachesis muta*. A peçonha foi submetida a uma filtração em gel em coluna *HiPrep Sephacryl S200*, obtendo-se as frações LmS-A a LmS-K. As frações LmS-G, LmS-H e LmS-I apresentaram elevada atividade fosfolipásica, com destaque para a fração LmS-G, que foi então submetida a uma cromatografia de fase reversa, obtendo-se um pico majoritário denominado Lmr-PLA₂. A sequência de aminoácidos da Lmr-PLA₂ apresentou alta identidade com PLA₂s já descritas na literatura, porém, com alguns resíduos distintos, caracterizando-a como uma nova PLA₂. Além disso, a enzima possui o resíduo D49 na sua sequência de aminoácidos, sugerindo ser uma PLA₂ cataliticamente ativa, confirmado pelo ensaio de atividade hemolítica indireta. A massa molar determinada por espectrometria de massas foi de 13,9 kDa. Através de eletroforese bidimensional, foi determinado o ponto isoelétrico de 5,49, indicando ser uma PLA₂ ácida. Os parâmetros cinéticos obtidos foram velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis (K_m) de 1,147 nmol/min/mL e 0,404 mM além de $K_{cat} = 0,41 \text{ min}^{-1}$, ou número de *turnover*, e a eficiência catalítica $K_{cat}/K_m = 1,02 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ sobre o substrato NOB (3-(*octanoyloxy*)benzoic acid). A Lmr-PLA₂ inibe a agregação plaquetária, é edematogênica, mas não é miotóxica. Os níveis plasmáticos de creatina cinase, proteínas, ureia e γ -glutamiltanspeptidase de camundongos que receberam injeção de Lmr-PLA₂ não foram alterados. Estes dados juntamente com as análises de miotoxicidade demonstraram que a enzima tem baixa toxicidade *in vivo*. A elevada atividade catalítica e baixa toxicidade da Lmr-PLA₂ tornam esta molécula promissora para o desenvolvimento de fármacos.

Palavras-chave: Peçonha de serpente, *Lachesis muta rhombeata*, fosfolipase A₂, edema.

ABSTRACT

Cordeiro, F.A. **Isolation, structural and biochemical characterization of a new phospholipase A₂ from *Lachesis muta rhombeata* venom.** 112f. Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Snakes contain numerous substances in their venom ranging from inorganic to complex proteins with different activities on various physiological systems. Snakes of the genus *Lachesis* are distributed in the rainforest of Central and South America, including Brazil. Among the substances found in the venom of these snakes are phospholipases A₂ (PLA₂), which constitute a family of enzymes that catalyze the hydrolysis of the sn-2 ester bond in glycerophospholipids and exhibit a variety of physiological and pathological activities, including neurotoxicity pre- and post-synaptic. They induce the formation of edema, affect platelet aggregation and are potent promoters of inflammation. The objectives of this work are the isolation, structural and biochemical characterization of a new PLA₂ present in the venom of *Lachesis muta rhombeata*. The role venom was subjected to gel filtration in *Sephacryl S200*, obtaining fractions LMS-A to LMS-K. The fractions LMS-G, LMS-H and LMS-I exhibited phospholipase activity, particularly the fraction LMS-G, which was then subjected to reversed phase chromatography, yielding a majority peak called Lmr-PLA₂. The amino acid sequence of Lmr-PLA₂ showed high identity with PLA₂s already described in the literature, but with some distinct residues, characterizing it as a new PLA₂. Additionally, this enzyme possesses the residue D49 in its amino acid sequence, indicating that one catalytically active PLA₂ confirmed by indirect hemolytic activity. The molar mass determined by mass spectrometry was 13.9 kDa and its isoelectric point 5.49, indicating that Lm-PLA₂ is an acid phospholipase. The kinetic parameters were $V_{max} = 1.147$ nmol/min/mL and $K_m = 0.404$ mM; $K_{cat} = 0.41$ min⁻¹, or *turnover* number, e a catalytic efficiency, $K_{cat}/K_m = 1.02$ mM⁻¹min⁻¹ with NOB (3-(*octanoyloxy*)benzoic acid) substrate. Lmr-PLA₂ inhibits platelet aggregation, causes edema, but it is not myotoxic. Plasma levels of creatine kinase, protein, urea and γ -glutamyltranspeptidase of mice injected with Lmr-PLA₂ have not changed. These data together with myotoxicity analysis showed that the enzyme has low toxicity *in vivo*. The high catalytic activity and low toxicity of Lmr-PLA₂ make this molecule promising for drug development.

Keywords: Snake venom, *Lachesis muta rhombeata*, phospholipases A₂, edema.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Serpentes brasileiras e acidentes ofídicos

Durante muito tempo, os animais peçonhentos e venenosos têm fascinado milhares de pessoas de diferentes culturas. Desde o desenvolvimento da ciência e medicina, as toxinas desses animais estão cercadas de mitos e realidades (HARVEY, 2009).

Atualmente, as serpentes constituem o segundo grupo mais diversificado dos répteis, com aproximadamente 3.200 espécies existentes no mundo, sendo que 375 espécies de serpentes ocorrem no Brasil (BÉRNILS; COSTA, 2011). Dentre as famílias encontradas no Brasil, somente duas são consideradas peçonhentas (Elapidae e Viperidae), pois possuem glândulas especializadas na produção de peçonha e aparelho inoculador (CARDOSO, 2009).

Com relação ao aparato inoculador, as serpentes podem ser áglifas (não possuem dentes com o ducto, mas podem ter glândula ou não); opistóglifas (possuem dentes inoculadores na região posterior do maxilar); proteróglifas (possuem dentes na região anterior do maxilar e são pouco desenvolvidos) ou solenóglifas (dentes desenvolvidos e na região anterior do maxilar) (BRASIL, 2012).

As serpentes da família Viperidae representam o grupo de serpentes que causam maior impacto na área da saúde pública, pois são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos de relevância clínica não só no Brasil, mas também em outros países americanos. Esta família é representada pelos gêneros *Bothriopsis*, *Bothropoides*, *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Rhinocerophis* e têm dentição solenóglifa (BÉRNILS; COSTA 2011). Já a família Elapidae, apresenta 27 espécies, sendo a maioria pertencente ao gênero *Micrurus* (BÉRNILS; COSTA 2011), que são serpentes com dentição proteróglifa (MELGAREJO, 2009).

De acordo com o Ministério da Saúde, o Brasil apresentou 30.836 acidentes ofídicos em 2011, sendo o maior número de casos ocorridos na região Norte (9.309), seguido das regiões Nordeste (8.081), Sudeste (7.493), Centro-Oeste (3.285) e Sul (2.668) (Fig. 1). Foram registrados 143 óbitos relacionados a esses acidentes (BRASIL, 2012). Observa-se o grande número de casos que acontecem anualmente no nosso país e isso revela uma das justificativas do estudo do componente dessas peçonhas e de suas atuações fisiopatológicas no envenenamento.

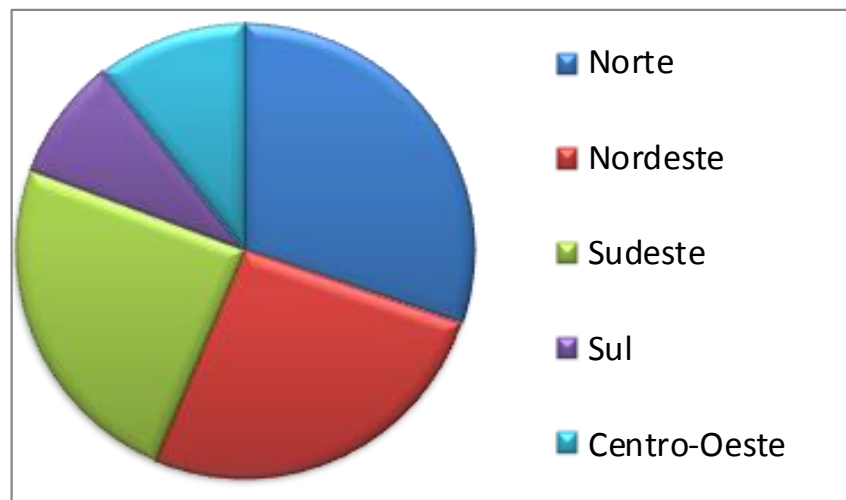


Figura 1. Relação entre os casos de acidentes ofídicos Em 2011 e as regiões do Brasil. Dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2012).

O maior número de acidentes ofídicos são causados pelas serpentes do gênero *Bothrops*, *Bothropoides*, *Bothriopsis* e *Rinocerophis* (jararacuçu, jararaca, urutu, caíçaca, comboia) e são caracterizados por uma ação proteolítica local, coagulante e hemorrágica. A ação proteolítica é demonstrada através de edema, bolha e necrose no local da picada, causando lesões locais e destruição tecidual. Além disso, podem ocorrer equimoses, sangramentos locais e até amputação do membro afetado (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009).

Com relação à atividade coagulante, a peçonha botrópica tem uma ação semelhante à trombina levando ao consumo de fibrinogênio e incoagulabilidade sanguínea, que juntamente com a ação de hemorraginas na membrana basal dos capilares sanguíneos provocam sangramentos tanto no local da picada quanto em mucosas (gingivorragia, epistaxe, sangramento bucal) e urinário. Com isso, podem ocorrer complicações como insuficiência renal aguda e choque, levando muitas vezes o paciente a óbito (CAMPBELL; LAMAR, 1989; FRANÇA; MÁLAQUE, 2009).

Já o acidente crotálico (gênero *Crotalus*) possui ação sistêmica preponderante. Ele é caracterizado por uma atividade neurotóxica através da atuação de uma neurotoxina pré-sináptica, a crotóxina. Essa toxina inibe a liberação de acetilcolina, causando paralisia flácida da musculatura esquelética facial, ocular e podendo levar à insuficiência respiratória. Além da crotóxina, são encontradas na peçonha outras neurotoxinas, como a crotamina, convulxina e giroxina (CAMPBELL; LAMAR, 1989; MARQUES; HERING; CUPO, 2009).

Além da ação neurotóxica, o envenenamento por essas serpentes possui uma ação miotóxica, pela ação de miotoxinas na musculatura esquelética e liberação de mioglobina,

podendo levar à insuficiência renal aguda. Outra atividade encontrada na peçonha é a coagulante atribuída a componentes com atividade trombina-símile (MARQUES; HERING; CUPO, 2009).

O acidente elapídico é causado pelas serpentes do gênero *Micrurus*, corais verdadeiras, e não provoca alterações locais evidentes, porém suas alterações sistêmicas são muito graves. A peçonha dessas serpentes possui uma ação neurotóxica pré e pós-sináptica importante e as manifestações do envenenamento são dor, visão dupla, ptose palpebral e pode ocorrer paralisia da musculatura respiratória pouco tempo após a picada (SILVA JR.; BUCARETCHI, 2009).

1.2. Gênero *Lachesis*

As serpentes da família Viperidae e gênero *Lachesis* são as maiores serpentes peçonhentas da América Latina, podendo atingir até 4 m de comprimento. É conhecida no Brasil como surucucu, surucucu-pico-de-jaca e surucutinga. Devido ao seu tamanho, a quantidade de peçonha obtida é, em geral, bastante superior àquela extraída de outras serpentes como *Bothrops* e *Crotalus* (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009).

O gênero *Lachesis* incluía em sua única espécie *muta*, quatro subespécies: *L. m. stenophrys*, distribuída na costa Atlântica da Nicarágua, além de Costa Rica, Panamá e na Colômbia na sua região do Oceano Pacífico; *L. m. melanocephala*, restrita da Costa Rica; *L. m. muta* presente em florestas tropicais da Colômbia, Venezuela, Guianas, Suriname, Peru, Equador e Brasil e *L. m. rhombeata* presente na floresta atlântica do nordeste brasileiro, mais precisamente do Ceará ao Rio de Janeiro (CAMPBELL; LAMAR, 1989). No entanto, segundo estudos realizados por Zamudio e Greene (1997), através de análises filogenéticas da sequência de DNA mitocondrial, as serpentes do gênero *Lachesis* devem ser classificadas em três diferentes espécies: *L. stenophrys* e *L. melanocephala* distribuídas na América Central e *L. muta* na América do Sul. Ou seja, segundo os autores, as espécies *Lachesis muta muta* e *Lachesis muta rhombeata* podem ser denominadas apenas de *Lachesis muta* (Fig. 2).



Figura 2. Serpente *Lachesis muta rhombeata*. Fonte: Laboratório de Toxinas Animais Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Ribeirão Preto - USP.

Apesar de concluírem que não havia diferenças significativas entre as duas subespécies, Zamudio e Greene (1997) observaram que as serpentes obtidas do Mato Grosso (*L. m. muta*) eram mais próximas das obtidas da floresta atlântica (*L. m. rhombeata*) do que de espécies obtidas do Suriname e Equador (*L. m. muta*) sugerindo que uma revisão dessa taxonomia deveria ser realizada.

Fernandes, Franco e Fernandes (2004) analisaram diferentes espécies e subespécies de *Lachesis* com relação aos aspectos morfológicos externos dessas serpentes. Segundo os autores, as espécies centro-americanas *L. stenophrys* e *L. melanocephala* são espécies distintas e a *L. muta* seria monotípica, ou seja, não teria a divisão em subespécies. Eles sugerem que há uma independência entre as espécies da América Central e do Sul e que esses estudos corroboram com dados experimentais.

Porém, Madrigal et al. (2012), reportam que atualmente o gênero *Lachesis* tem sido classificado em 4 espécies: *L. stenophrys*, *L. melanocephala*, *L. muta* e *Lachesis acrochorda* (“Chochoan busmaster”), sendo esta última encontrada no Panamá, tanto na região do oceano Pacífico quanto Atlântico e no noroeste da Colômbia.

Análises filogenéticas combinadas com dados estatísticos sugerem que a *L. melanocephala* tem os componentes de sua peçonha mais próximos aos da serpente *Lachesis stenophrys* do que da *Lachesis muta* (MADRIGAL et al., 2012).

Vários estudos de proteoma têm sido realizados com essas serpentes a fim de se determinar as divergências ou semelhanças entre as peçonhas de diferentes espécies incluídas no gênero *Lachesis* e também para identificar suas alterações ontogenéticas, ou seja, as diferenças encontradas na peçonha de acordo com a idade da serpente.

Otero e colaboradores (1998) compararam a peçonha de três subespécies de *Lachesis muta* (*Lachesis muta stenophrys*, *Lachesis muta muta* e *Lachesis muta rhombeata*) do Brasil, Colômbia e Costa Rica, e mostraram que todas as peçonhas induzem hemorragia, formação de edema, miotoxicidade e efeito defibrinante e coagulante. Além disso, encontraram também atividades proteolíticas e hemolíticas. Os resultados demonstraram que as peçonhas de *Lachesis muta stenophrys* e de *Lachesis muta muta* possuem maior letalidade e atividade hemorrágica, enquanto que a peçonha de *Lachesis muta rhombeata* mostra maior atividade coagulante; no entanto, não há grandes diferenças na miotoxicidade e formação de edema. Apesar das diferenças quantitativas em toxicidade e atividades enzimáticas entre as peçonhas, todas elas apresentam perfis patofisiológicos semelhantes.

O envenenamento por esse gênero de serpentes é raro, pois o fato de habitarem florestas tropicais torna difícil sua captura e manutenção em cativeiro. A peçonha das serpentes do gênero *Lachesis* possui ação proteolítica, coagulante, hemorrágica e neurotóxica e, apesar de difíceis de ocorrer, os acidentes laquéticos costumam ser graves. Os sintomas clínicos são: dor, edema, hipotensão, alteração da coagulação sanguínea, sangramentos e síndrome vagal, com náuseas, vômitos e diarreia (JORGE et al., 1997; PARDAL et al., 2007).

Esses sintomas são semelhantes aos do acidente botrópico; porém, a síndrome vagal (hipotensão, náuseas, vômitos e diarreia) só ocorre no acidente laquético, sendo importante no diagnóstico diferencial. A ausência de sintomas neurotóxicos não significa necessariamente tratar-se de envenenamento botrópico, pois parte dos acidentes laquéticos não apresentam esses sintomas. Diferem também quanto à ação coagulante, sendo bem mais intensa no acidente laquético (CARDOSO et al., 2009).

O tratamento é realizado com aplicação de soro antibotrópico-laquético por via intravenosa e a quantidade aplicada vai depender da gravidade do caso. Os casos são classificados apenas em moderados ou graves (PARDAL et al., 2007).

O soro antibotrópico-laquético possui a propriedade de neutralizar os efeitos induzidos tanto pela peçonha botrópica quanto laquética; porém, a administração desse soro tem uma série de desvantagens que residem na baixa eficiência do soro (a imunização de animais com misturas complexas de antígenos pode levar à produção de anticorpos predominantemente contra as toxinas presentes em apenas uma das espécies; e redução da resposta imune devido à presença de proteínas na peçonha com atividade imunossupressora). O ideal seria a administração de um soro monoespecífico (CARDOSO et al., 2009).

1.3. Composição de peçonhas

As peçonhas de serpentes e outros animais têm sido analisadas por apresentarem inúmeras substâncias de composições distintas. Esses componentes ativos despertam grande interesse entre os pesquisadores, pois podem ser utilizados como ferramentas importantes para o estudo de vários processos fisiológicos e patológicos, como a inflamação, agregação plaquetária, hemostasia, entre outros (COMINETTI; PONTES; SOUZA, 2007).

Cerca de 90% a 95% do peso seco da peçonha consiste de proteínas. Dessas proteínas, um grande número são responsáveis por interferir na hemostasia, em processos inflamatórios e por causarem hemorragias, como serinoproteases, fosfolipases A₂ (PLA₂), metaloproteases, e outras, como desintegrinas e lectinas tipo-C, que não possuem atividade enzimática (BRAUD; BON; WISNER, 2000; MARKLAND, 1998), mas contribuem para os danos ocasionados nas vítimas.

Os componentes podem ser divididos em inorgânicos e orgânicos. Entre os inorgânicos estão: cálcio, ferro, cobre, manganês, zinco, e os orgânicos são classificados como proteínas, carboidratos, lipídeos, nucleotídeos, aminas biogênicas, entre outros (VARANDA; GIANNINI, 1999). As toxinas animais são muito complexas, contendo polipeptídeos, proteínas de alta e baixa massa molar, lipídeos, esteroides, polissacarídeos, glicosídeos, aminoácidos livres, bem como histamina, serotonina e outras substâncias (WATKINS, 2008).

O estudo dessas diferentes toxinas é muito relevante, pois servem como ferramentas para a compreensão de sistemas fisiológicos complexos, como sistema nervoso, cardiovascular, coagulação e homeostasia. Além disso, podem ser utilizadas como novas fontes para a formulação de fármacos que poderão ser administrados como agentes terapêuticos sobre diversas patologias.

Com relação à peçonha da serpente *Lachesis muta*, esta possui componentes orgânicos e inorgânicos. Dentre os constituintes orgânicos, podemos citar as proteínas, peptídeos, aminoácidos, carboidratos e lipídeos. Entre os constituintes inorgânicos presentes estão Zn⁺², Ca⁺², K⁺, Mg⁺², Na⁺, SO₄⁻², Cl⁻, PO₄⁻³ (CARDOSO et al., 2009).

Até o momento foram descritas na peçonha de *L. muta* enzimas semelhantes à trombina ou trombina-símile (MAGALHÃES et al., 2006), peptídeos potenciadores de bradicinina (GRAHAM et al., 2005), metaloproteases, como a LHF-I e II (RUCAVADO et al., 1999), uma L-aminoácido oxidase (BREGGE-SILVA et al., 2012), lectina (ARAGÓN-

ORTIZ; BRENES-BRENES; GUBENSEK, 1989) e fosfolipases A₂ (FULY, 2000; DAMICO, 2012).

1.4. Fosfolipase A₂

Os componentes da peçonha de *Lachesis*, assim como os componentes das demais serpentes da família Viperidae, são em sua maioria, enzimas. Dentre estas podemos citar as fosfolipases que catalisam a hidrólise dos fosfolipídeos que compõe as membranas celulares em quatro diferentes posições. Essas enzimas recebem designações diferentes dependendo do sítio de hidrólise.

No caso das fosfolipases A₂ (PLA_{2s}) [E.C 3.1.1.4], a quebra da ligação ocorre na posição sn-2 dos fosfolipídeos (Fig. 3) de membranas biológicas e artificiais, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídios (ARNI; WARD, 1996; BURKE; DENNIS, 2009; KINI, 2006; KUDO; MURAKAMI, 2002).

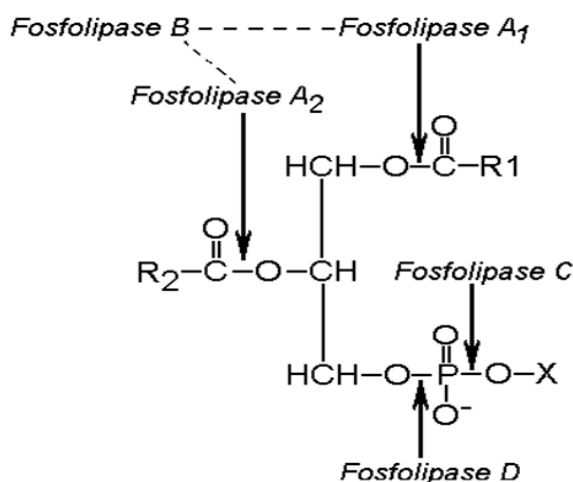


Figura 3: Posição de hidrólise das fosfolipases. Fonte: Kini (1997).

As PLA_{2s} são amplamente encontradas em mamíferos. Por clivar os fosfolipídeos de membrana, essas enzimas possuem um papel fundamental no catabolismo de lipídeos da dieta, além de participar da manutenção de fosfolipídeos celulares e remodelamento das membranas (DENNIS, 1994).

Entre os ácidos graxos liberados com a quebra da ligação, está o ácido araquidônico que é um precursor de eicosanóides e promotor da inflamação (DENNIS, 1997). As fosfolipases A₂ também são encontradas no meio extracelular em secreções pancreáticas e exsudatos de inflamações.

As PLA₂s são classificadas em 15 grupos com base no padrão de pontes dissulfeto, similaridade de sequência de aminoácidos e mecanismos catalíticos (hidrolases His/Asp, Ser/Asp ou Ser/His/Asp). Estes grupos são ainda divididos em vários subgrupos, de acordo com diferenças estruturais e funcionais (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

Inicialmente, as PLA₂s de serpentes foram classificadas nos grupos I e II e a de abelha no grupo III. Com a descoberta de duas PLA₂s humanas, uma secretada (1989) e a outra citosólica (1991), foi necessário estabelecer uma sistemática para a classificação de PLA₂s. As duas últimas foram classificadas nos grupos II (e depois IIA) e III (IIIA), respectivamente. Nos últimos anos novas classificações têm sido publicadas (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

Dentro desses grupos estão incluídas: as PLA₂s secretórias (sPLA₂s), que são encontradas nas serpentes, mamíferos e plantas; as independentes de Ca²⁺ (iPLA₂s), que são proteínas de membrana de fonte murina e humana; as citosólicas (cPLA₂s), que são encontradas no citosol; as PLA₂s lisossomais, que são enzimas glicosiladas encontradas nos lisossomas; além das acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH) (KANG et al., 2011; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As sPLA₂s possuem massa molar entre 14-18 kDa, são extremamente estáveis e comumente encontradas na peçonha de serpentes (Hydrophidae, Elapidae, Viperidae e Crotalidae), abelhas, escorpiões, vespas ou em órgãos de mamíferos, como fígado e rins (KANG et al., 2011; SILVEIRA, 2011; VARANDA; GIANNINI, 1999).

Além disso, as sPLA₂s contêm de 5 a 8 pontes dissulfeto e exercem sua função de catálise na presença de íons Ca²⁺. Essa classe de PLA₂s secretória é encontrada nos grupos IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, XIA, XIB, XII, XIII e XIV (RODRIGUES 2010; BURKE; DENNIS, 2009; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As sPLA₂s ofídicas, como já dito anteriormente, estão presentes nos grupos I e II, sendo que o I pertence às famílias Elapidae e Hydrophidae e o II à família Viperidae. Elas são constituídas de 120 a 125 resíduos de aminoácidos, e as enzimas do grupo II possuem 5 a 7 resíduos de aminoácidos a mais do que o grupo I. A estrutura conservada dessa proteína corresponde a 3 hélices principais com 7 pontes dissulfeto interligadas entre elas (CARVALHO, 2011; KANG et al., 2011).

O grupo II das PLA₂s é dividido em: PLA₂s Asp49, que possuem o aminoácido aspartato na posição 49 e PLA₂s Lys49, que possuem o aminoácido lisina na mesma posição. As Asp49 são, em sua grande maioria, cataliticamente ativas, enquanto que as Lys49 não possuem atividade enzimática sobre substratos ou a atividade é baixa. Porém, mesmo sendo cataliticamente inativas ou tendo baixa atividade, as fosfolipases A₂ Lys49 possuem atividade

biológica causando elevada miotoxicidade (ZULIANI et al., 2005). É importante ressaltar que essas enzimas podem ser ácidas ou básicas, independentemente do resíduo presente na posição 49 (RODRIGUES, 2010).

As PLA₂s Lys49 são incapazes de incorporar o íon Ca²⁺ à sua molécula. Esse íon é fundamental para a atividade catalítica, atuando como cofator. Ele estabiliza o intermediário da ligação e orienta o substrato ao local de hidrólise. O grupamento carboxila presente no resíduo da Asp49 juntamente com 3 moléculas de oxigênio presentes nos resíduos Tyr28, Gly30 e Gly32, são responsáveis pela ligação do cálcio (SCOTT et al., 1990; VERHEIJ et al., 1980).

No mecanismo modelo de hidrólise dessas moléculas, o aminoácido His na posição 48 juntamente com o aminoácido Asp na posição 99 funcionam em conjunto como acceptor de prótons, facilitando o ataque nucleofílico na posição sn-2 do fosfolípideo (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

Esse mecanismo de ação das PLA₂ ocorre em três etapas: 1) desprotonação da molécula de água pelos aminoácidos His48 e Asp99; 2) a água desprotonada atua como nucleófilo na ligação sn-2 do glicerofosfolípideo e ocorre a formação de um intermediário tetraédrico estabilizado pelo cofator Ca²⁺ e 3) ocorre a quebra do intermediário tetraédrico com liberação dos ácidos graxos e lisofosfolípeos (BERG et al., 2001; VERHEIJ et al., 1980).

Embora a grande maioria das fosfolipases Asp49 sejam cataliticamente ativas, Corrêa et al., (2008) realizaram estudos sobre uma PLA₂ (Bth-TX-II) da serpente *Bothrops jararacussu* que apesar da presença do resíduo Asp na posição 49, possui baixa atividade catalítica e elevada miotoxicidade. Os autores demonstraram que há uma distorção dessa molécula com relação à sua região de ligação ao cálcio e um deslocamento da região C-terminal, explicando sua baixa atividade catalítica. Dessa forma, fica claro que ter os aminoácidos responsáveis pela ligação ao cálcio não garantem que as PLA₂s tenham atividade catalítica. Estes resíduos devem estar coordenados para realizar a ligação com o íon.

Com relação à estrutura, as PLA₂s possuem muitos resíduos conservados nas suas moléculas, principalmente entre os aminoácidos responsáveis pela atividade catalítica. Mesmo possuindo alta identidade sequencial, as PLA₂s possuem algumas diferenças entre os grupos I e II (KANG et al., 2011). As diferenças estão principalmente nas posições de resíduos de cisteína nas suas sequências. As enzimas dos dois grupos possuem 7 pontes dissulfeto. As PLA₂s do grupo II apresentam 5-7 resíduos de aminoácidos a mais no C-terminal do que as do grupo I (KANG et al., 2011).

As PLA₂s do grupo I (famílias Elapidae e Hydrophidae) possuem 7 pontes dissulfetos entre os aminoácidos Cys11-Cys72 (sendo exclusiva desse grupo), Cys27-Cys119, Cys29-Cys45, Cys44-Cys100, Cys51-Cys93, Cys 61-Cys86 e Cys 79-Cys91. As estruturas cristalográficas das fosfolipases do grupo II consistem em α -hélice H1 N-terminal (resíduos 2-12), α -hélice H2 (resíduos 40-55) e α -hélice H3 (resíduos 86-103) (KANG et al., 2011). Além disso, contêm duas folhas- β antiparalelas nas posições 70-73 e 76-79, como demonstrado na figura 4:

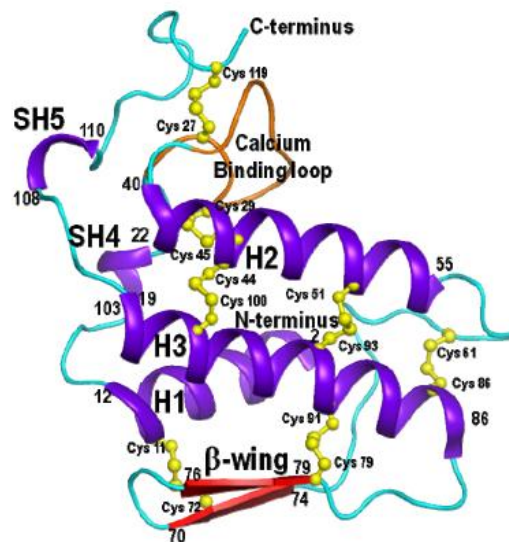


Figura 4: Estrutura tridimensional representativa de PLA₂s do grupo I. Fonte: Kang et al., 2011.

As estruturas cristalográficas de várias PLA₂s do grupo I já foram determinadas, como por exemplo, das serpentes *Naja naja naja* (SINGH et al., 2005), *Ophiophagus hannah* (XU et al., 2003) e da *Naja naja saittifera* (JABEEN et.al., 2006).

As PLA₂s do grupo II também possuem 3 α -hélices: H1 N-terminal (resíduos 2-12), hélice H2 (resíduos 40-55) e hélice H3 (resíduos 90-108), sendo que as H1 e H3 são antiparalelas e são o cerne da proteína. Além disso, possuem duas pequenas hélices adicionais (SH4 e SH5), duas folhas- β antiparalelas, a alça de ligação do cálcio (resíduos 25-35) e uma alça externa muito característica (resíduos 14-23) (KANG et al., 2011) (Figura 5).

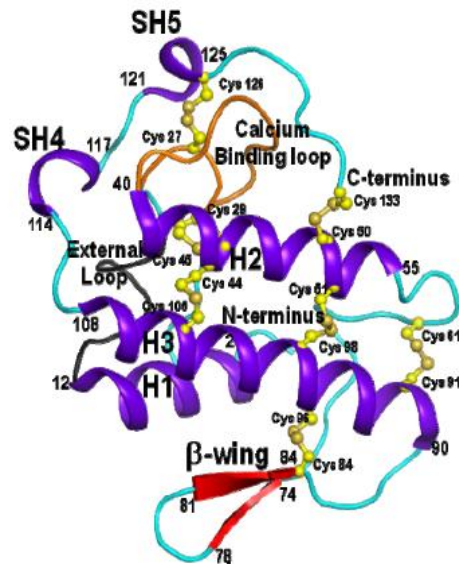


Figura 5: Estrutura tridimensional representativa de PLA₂s do grupo II. Fonte: Kang et al., 2011.

As PLA₂s do grupo II têm sido extensivamente estudadas, principalmente por serem consideradas importantes alvos terapêuticos de anti-inflamatórios. Por esse motivo, várias estruturas desse grupo de PLA₂s já foram elucidadas, como da serpente *Echis carinatus* (JASTI et al., 2004), da *Bothrops jararacussu* (KETELHUT et al., 2003), *Daboia russelli* (CHANDRA et al., 2000), entre outras.

1.5. Efeitos farmacológicos das PLA₂s

Embora as PLA₂s de peçonhas de serpentes apresentem alta identidade entre suas estruturas primárias, secundárias e terciárias, estas enzimas possuem uma grande variedade de efeitos farmacológicos. Até o momento, a sequência de aminoácidos de mais de trezentas PLA₂s de peçonhas de serpentes já foram depositadas. Essas sequências possuem de 44-99% de identidade (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

Além disso, os efeitos farmacológicos das PLA₂s são independentes ou dependentes da sua atividade enzimática. Quando dependentes da atividade enzimática, há a hidrólise da membrana e a liberação de ácidos graxos e lisofosfolípídeos. Esses irão atuar como mediadores sobre diversas atividades biológicas, como ativadores de plaquetas, lise celular e formação do ácido araquidônico. Este servirá como um precursor da síntese de segundos mensageiros, como prostaglandinas e tromboxanos (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

No mecanismo independente da atividade enzimática, a PLA₂ pode causar seu efeito farmacológico como antagonista ou agonista de alvos celulares. Nas interações antagonistas, essas enzimas competem com os ligantes naturais ou primeiros mensageiros dos receptores celulares, aumentando a produção de segundos mensageiros (como cAMP e Ca²⁺). Na interação agonista, elas atuam como ligantes, aumentando a concentração de segundos mensageiros no alvo celular (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

Kini e Evans (1987) identificaram uma região anticoagulante das PLA₂s entre os resíduos 54 e 77, sendo que a diferença dessas enzimas com relação à sua atividade anticoagulante (forte, fraca e sem atividade) estaria relacionada aos resíduos presentes nessa região. Quando essa porção de aminoácidos é carregada positivamente, a atividade anticoagulante é forte; porém, quando carregada negativamente, a atividade é fraca ou não ocorre (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

Além disso, de acordo com Dos Santos et al. (2009), PLA₂s Lys49 têm sido alvo de muitos estudos devido à sua intensa atividade miotóxica. O sítio responsável por essa atividade vem sendo estudado extensivamente por pesquisadores. Estudos com peptídeos sintéticos e mutagênese sítio-dirigida sugerem que a região C-terminal das PLA₂s é a responsável pela sua atividade miotóxica. Lomonte et al. (2003) propuseram um modelo de interação dessa região C-terminal com a membrana. De acordo com os autores, essa região entre as posições 115 e 129 seria composta de aminoácidos carregados positivamente, os quais interagiriam com a membrana aniônica fosfolipídica.

As PLA₂s Lys49 miotóxicas das serpentes do gênero *Bothrops* são diméricas. Segundo Ângulo et al., (2005), a dissociação desses dímeros diminui a miotoxicidade. Dos Santos et al. (2009) complementam esta hipótese, sugerindo que a simetria entre os dois monômeros é fundamental para a atividade miotóxica da região C-terminal.

De acordo com Doley, Zhou e Kini (2010), as PLA₂s possuem alguns sítios específicos de ligação, como é o caso do sítio neurotóxico. Kini e Iwanaga (1986) propuseram que a hélice E hidrofóbica, presente na estrutura das PLA₂s neurotóxicas, estaria relacionada à neurotoxicidade pré-sináptica dessas enzimas. Khan (2002), através da comparação entre 40 sequências de aminoácidos de PLA₂s neurotóxicas notou que essas enzimas possuíam um sítio hidrofóbico na região 80-110 de seus aminoácidos. Já Pungercar et al. (1999), através de estudos de mutagênese sítio-dirigida, identificaram que o aminoácido fenilalanina na posição 124 (Phe124) na região C-terminal estaria relacionado à neurotoxicidade dessas enzimas.

Com relação à agregação plaquetária, as PLA₂s podem ser classificadas em três grupos distintos: a) PLA₂s que iniciam a agregação plaquetária; b) PLA₂s que inibem a agregação

plaquetária, e esse efeito pode ou não estar relacionado com a atividade catalítica e c) PLA₂s de efeito bifásico, que induzem a agregação em baixas concentrações e pouco tempo de incubação, mas que inibem a agregação das plaquetas em maiores concentrações (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010; KINI; EVANS, 1997).

Outro efeito atribuído às PLA₂s é a indução de edema. Essa atividade estaria relacionada à hidrólise de fosfolípídeo e liberação de ácido araquidônico, que é transformado em prostaglandina e leucotrienos. Este último aumenta a permeabilidade vascular levando à formação de edema (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

Várias fosfolipases A₂ de peçonhas ofídicas têm sido isoladas das espécies de *Bothrops jararacussu* (FULY et al., 2004; KETELHUT et al., 2003) e possuem uma alta atividade PLA₂. Danielle et al. (1995; 1997) isolaram e caracterizaram três PLA₂s ácidas da serpente *B. neuwiedi* com atividade miotóxica.

Outras PLA₂s de serpentes *Bothrops* foram caracterizadas, demonstrando atividades tóxicas sobre fígado, pulmões, coração (NISEBOM; SEKI; VIDAL, 1986), inibição da agregação plaquetária (MODESTO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007), atividade hemolítica indireta (RODRIGUES et al., 2007) e atividade antibacteriana, antitumoral e antifúngica (SANTOS-FILHO et al., 2008).

Além dessas atividades descritas acima, as PLA₂s encontradas em peçonhas, podem induzir cardiotoxicidade, neurotoxicidade, edema, efeito anticoagulante e hipotensão (KETELHUT et al., 2003; LEITE, 2007; STILES; SEXTON; WEINSTEN, 1991).

Até o momento, cinco PLA₂s da peçonha de *Lachesis muta* já foram isoladas e caracterizadas. Duas isoformas ácidas, LM-PLA₂-I e LM-PLA₂-II, induzem mionecrose em camundongos, com ação direta sobre as fibras musculares ou agindo indiretamente pela liberação de creatina-quinase (FULY et al., 2000; 2002). E três PLA₂s básicas, Lmr-Tx, LmTx-I e II, com atividade antitrombótica e anticoagulante (DAMICO et al., 2005; 2012).

1.6. PLA₂s como alvos terapêuticos

Pelo fato de possuírem inúmeros efeitos farmacológicos, como vimos anteriormente, as PLA₂s têm sido estudadas como futuros alvos terapêuticos ou servindo de base para o desenvolvimento de novos fármacos. Segundo Yedgar, Lichtenberg e Schnitzer (2000), o estudo de inibidores específicos de PLA₂s pode ser importante na produção de moléculas anti-inflamatórias. Um exemplo é o inibidor de sPLA₂, LY3330, que têm demonstrado eficácia

nos estudos para o tratamento de paciente asmáticos e com artrite reumatoide (BOWTON et al., 2005; BRADLEY et al., 2005).

Além disso, Rodrigues et al. (2009), descrevem que a atividade fosfolipásica está aumentada em diversos tipos de cânceres humanos. Segundo os autores, essas enzimas têm um papel fundamental no desenvolvimento e progressão tumoral, servindo, assim, de alvos na terapia anticâncer.

Muitos estudos demonstraram uma atividade antitumoral direta das PLA₂s. Segundo Rodrigues et al. (2009), essa atividade seria independente da atividade catalítica. Essas enzimas estariam envolvidas em processos de citotoxicidade e miotoxicidade. Estudos sugerem que esse efeito é alcançado devido à inibição do fator de crescimento do endotélio vascular, relacionado com a angiogênese (ZULIANI et al., 2005; STÁBELI et al., 2006).

Outra atividade farmacológica relacionada às PLA₂s, é a antimicrobiana. Segundo Weiss et al. (1994), a basicidade presente na hélice N-terminal de algumas PLA₂s seria a responsável por uma ação bactericida dessas enzimas. Nevalainen, Graham e Scott (2007) relatam que os mecanismos antimicrobianos das PLA₂s estão baseados na presença de cargas positivas na sua estrutura e na sua atividade fosfolipídica. Além disso, as PLA₂s estariam aumentadas em casos de sepse e de choque séptico, ou seja, a inibição dessas enzimas poderia servir de alvo terapêutico no controle e tratamento de doenças relacionadas à atividade microbiana.

As PLA₂s das peçonhas de serpentes são um grande desafio com relação à determinação da sua estrutura-função e seu mecanismo de ação. Por esse motivo, o estudo dessas enzimas com relação à sua estrutura e atividade é de extrema importância para o conhecimento de suas interações e dos seus alvos celulares (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

Dada a importância biológica das fosfolipases A₂, o presente trabalho tem a finalidade de apresentar a purificação de uma nova PLA₂ da peçonha da serpente *L. muta* e a caracterização bioquímica, estrutural e funcional da enzima através de estudos sobre a agregação plaquetária, formação de edema e miotoxicidade.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

No presente trabalho isolamos e caracterizamos bioquímica e funcionalmente uma nova fosfolipase A₂ da peçonha da serpente *Lachesis muta rhombeata*, denominada Lmr-PLA₂.

A Lmr-PLA₂ foi isolada através de dois passos cromatográficos: uma filtração em gel, seguida de fase reversa em coluna C18. Esses dois passos cromatográficos foram suficientes para a obtenção da enzima pura, fato que foi comprovado pelo gel de SDS-PAGE e pela espectrometria de massas. Com a espectrometria foi possível determinar que a massa molar da Lmr-PLA₂ é 13,97 kDa.

O ponto isoelétrico foi determinado por eletroforese bidimensional, demonstrando que a Lmr-PLA₂ tem o pI de 5,46 e é, portanto, considerada uma PLA₂ ácida. Com o sequenciamento, notou-se que a Lmr-PLA₂ possui semelhança com outras fosfolipases de *Lachesis*, mas possui resíduos diferentes em sua sequência, o que a caracteriza como uma nova PLA₂.

Os parâmetros cinéticos foram obtidos com o substrato NOB (4N₃OBA). A velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis (K_m) equivalem a 1,147 nmol/min/mL e 0,404 mM, respectivamente. Outro parâmetro cinético obtido foi o $K_{cat} = 0,41 \text{ min}^{-1}$, ou número de *turnover*, e a eficiência catalítica $K_{cat}/K_m = 1,02 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$. A Lmr-PLA₂ é a primeira fosfolipase de *Lachesis* que tem seus parâmetros cinéticos determinados. A determinação desses parâmetros é fundamental para análise de eficiência catalítica e especificidade a substratos.

Com relação às atividades biológicas, a Lmr-PLA₂ demonstrou inibir a agregação plaquetária, porém de maneira pouco significativa; demonstrou ser edematogênica, porém também de maneira pouco significativa e demonstrou não ter atividade miotóxica através da dosagem de CK e análise histológica.

Além disso, foram determinados parâmetros bioquímicos no plasma de camundongos que tiveram injeção de Lmr-PLA₂, que não demonstraram diferenças significativas com relação ao controle.

Dessa forma, concluímos que a Lmr-PLA₂ é uma fosfolipase ácida de baixa toxicidade, quando comparada com outras PLA₂s, fato demonstrado através da baixa miotoxicidade e formação de edema apenas em maiores concentrações.

A baixa toxicidade é uma vantagem da Lmr-PLA₂ e permite que essa enzima possa ser utilizada no delineamento de novos fármacos. Além disso, o fato de não ser tóxica mesmo

tendo semelhança com as PLA₂s tóxicas contribui para o estudo da relação estrutura-função dessas proteínas, através do estudo das diferenças entre suas sequências e como elas atuam nos receptores e membranas celulares.

REFERÊNCIA

6. REFERÊNCIAS

ANGULO, Y.; GUTIERREZ, J.M.; SOARES, A.M.; CHO, W.; LOMONTE, B. Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A(2) homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation, **Toxicon**, v.46, p.291–296, 2005.

ARAGÓN-ORTIZ, F.; BRENES-BRENES, J.R.; GUBENSEK, F. Characterization of a lectin-like protein isolated from *Lachesis muta* venom. **Revista de Biología Tropical**, v.37, p.78-83, 1989.

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

BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas, 1994.

BERG, O.G.; GELB, M.H.; TSAI, M.D.; JAIN, M.K. Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A₂-paradigm. **Chemical Reviews**, v.101, p.2613-2654, 2001.

BÉRNILS, R.S.; COSTA, H.C. **Brazilian reptiles**: List of species (2011). Disponível em : <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acesso em 08/12/2012. 2011.

BONFIM, V.L.; PONCE-SOTO; L.A.; MARTINS DE SOUZA, D.; SOUZA, G.H.M.F.; BALDASSO, P.A.; EBERLIN, M.N.; MARANGONI, S. Structural and functional characterization of myotoxin, Cr-IV 1, a phospholipase A₂ D49 from the venom of the snake *Calloselasma rhodostoma*. **Biologicals**, v.36, p.168-176, 2008.

BORDON, K.C.F. **Caracterização funcional e estrutural da hialuronidase isolada da peçonha de serpente *Crotalus durissus terrificus***. 2012. 123f. (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto.

BOWTON, D.L.; DMITRIENKO, A.A.; ISRAEL, E.; ZEIHNER, B.G.; SIDES, G.D. Impact of a soluble phospholipase A₂ inhibitor on inhaled allergen challenge in subjects with asthma. **Journal of Asthma**, v. 42, p. 65-71, 2005.

BRADLEY, J.D.; DMITRIENKO, A.A.; KIVITZ, A.J.; GLUCK, O.S.; WEAVER, A.L.; WIESENHUTTER, D.; MYERS, S.L.; SIDES, G.D. A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial of LY333013, a selective inhibitor of group II secretory phospholipase

A₂, in the treatment of rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 32, p. 417-423, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Acidentes por serpentes**. Brasília, DF. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/texto/5817/783/acidentes-porserpentes.html>>. Acesso em: 12 de agosto de 2012.

BRAUD, S; BON, C; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v.82, p.851-859, 2000.

BREGGE-SILVA, C.; NONATO, M.C.; ALBUQUERQUE, S.; HO, P.L.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I.; DINIZ, M.R.V.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; ARANTES, E.C. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, v.60, p.1263-1276, 2012.

BURKE, J.E.; DENNIS, E.A. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, v.50, p.237-242, 2009.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The Venomous Reptiles of Latin America**. Cornell University Press. Ithaca. NY, 1989.

CANTÚ, M.D.; CARRILHO, E.; WULFF, N.A.; PALMA, M.S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v.31, p.669-675, 2008.

CARDOSO, J.L.C. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo- SP: Savier, 2009.

CARVALHO, C.D. **Ação do extrato bruto etanólico da *Cabernaemonlana catharinensis* e de seu alcalóide isolado sobre as atividades de fosfolipase A₂ ofídicas em preparação neuromuscular de camundongos**. 2011. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, 2011.

CHANDRA V.; KAUR P.; SRINIVASAN A.; SINGH T.P. Three-dimensional structure of a presynaptic neurotoxic phospholipase A₂ from *Daboia russelli pulchella* at 2.4 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.296, 1117–1126, 2000.

CHAP, H.; ZWALL, R.F.A.; VAN DEENEN, L.L.M. Action of highly purified phospholipases on blood platelets. Evidence for an asymmetric distribution of phospholipids in the surface membrane. **Biochemical and Biophysical Acta**, v. 467, p.146, 1977.

CHAP, H.; PERRET, B.; MAUCO, G.; PLANTAVID, M.; LAFFONT, F.; SIMON, M.F. DOUSTE-BLAZY, L. Organization and role of platelet membrane phospholipids as studied with phospholipases A₂ from various venoms and phospholipases C from bacterial origin. **Toxicon**, v.20, p.291, 1982.

CHO, W.; KEZDY, F.J. Chromogenic Substrates and Assay oh Phospholipases A₂. **Methods in Enzymology**, v.197, p.75-79, 1991.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

COMINETTI, M.R; PONTES, C.L.S; SOUZA, D.H.F. Métodos cromatográficos e critérios de pureza. In: SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S; SOUZA, D.H.F. **Métodos em Toxinologia: toxinas de serpentes**. São Carlos: EduFSCar, 2007. p.11-23.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p.10881-10890, 1988.

CORRÊA, L.C.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; CINTRA, A.C.O.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; FONTES, M. R.M. Crystal structure of a myotoxic Asp-49-phospholipase A₂ with low catalytic activity: Insights into Ca²⁺ - independent catalytic mechanism. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1784, p. 591-599, 2008.

CREMONEZ, C.M. **Estudo da ação antiofídica do extrato das folhas e do suco de graviola (*Annona muricata*) no envenenamento por *Lachesis muta rhombeata***. 2011. 123f. (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto.

DAMICO, D.C.S.; LILLA, S.; DE NUCCI, G.; PONCE-SOTO, L.A. WINCK, F.V.; NOVELLO, J.C. Marangoni, S. Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp49 phospholipase A₂ isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, p. 75–86, 2005.

DAMICO, D.C.S.; BUENO, L.G.F.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S.; MARIA ALICE DA CRUZ-HOFLING, M. A.; NOVELLO, J.C. Functional characterization of a basic D49 phospholipase A₂ (LmTX-I) from the venom of the snake *Lachesis muta muta* (bushmaster). **Toxicon**, v.41, p. 759-765, 2006.

DAMICO, D.C.S.; VASSEQUI-SILVA, T.; TORRES-HUACO, F.D.; NERY-DIEZ, A.C.C.; DE SOUZA, R.C.G.; DA SILVA, S.L.; VICENTE, C.P. MENDES, C.B.; ANTUNES, E.; WERNECK, C.C.; MARANGONI, S. LmrTX, a basic PLA₂ (D49) purified from *Lachesis muta rhombeata* snake venom with enzymatic-related antithrombotic and anticoagulant activity. **Toxicon**, v.60, p.773-781, 2012.

DANIELLE, J.J.; BIANCO, I.D.; FIDELO, G.D. Kinetic and pharmacological characterization of phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi* venom. **Archives Biochimie et Biophysique**, v.318, p.65-70, 1995.

DANIELLE, J.J.; BIANCO, I.D.; DELGADO, C.; BRIONES CARRILO, D.; FIDELO, G.D.A. A new phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedi* (yarara chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**, v.35, p.1205-1215, 1997.

DE ASSIS, E.B.; ESTEVÃO-COSTA, M.I.; DO CARMO, V.A.; SILVA-NETO, A.; AGOSTINI, C.G.; ALVARENGA, M. M.; RICHARDSON, M.; FORTES-DIAS, C.L. Purification and complete primary structure of the first PLA₂ from *Lachesis stenophrys* (the Central American Bushmaster) snake venom. **The protein journal**, v.27, p.327-333, 2008.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.13057-13060, 1994.

DENNIS, E.A. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. **Trends Biochemical Sciences**, v.22, p.1-2, 1997.

DIZ FILHO, E.B.S.; MARANGONI, S.; TOYAMA, D.O.; FAGUNDES, F.H.R.; OLIVEIRA, S.C.B.; FONSECA, F.V.; CALGAROTTO, A.K.; JOAZEIRO, P.P.; TOYAMA, M.H. Enzymatic and structural characterization of new PLA₂ isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**, v.53, p.104-114, 2009.

DOLEY, R.; ZHOU, X.; KINI, M. Snake Venom Phospholipase A₂ Enzymes. In: Mackessy, S. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. 1 ed. Taylor & Francis, 2010, p.173-205.

DOS SANTOS, J.I.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **Journal of Structural Biology**, v.167, p.106-116, 2009.

EDMAN, P.; BEGG, G., A protein sequenator. **European Journal of Biochemistry**, v.1, p.80-91, 1967.

FERNANDES, D.S.; FRANCO, F.L.; FERNANDES, R. Systematic revision of the genus *Lachesis* Daudin, 1803 (serpentes, Viperidae). **Herpetologica**, v.60, p.245-260, 2004.

FERREIRA, T.; CAMARGO, E.A.; RIBELA, M.T.C.P.; DAMICO, D.C.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LANDUCCI, E.C.T. Inflammatory oedema induced by *Lachesis muta muta* (Surucucu) snake venom and LmTX-I in the rat paw and dorsal skin. **Toxicon**, v.53, p. 69-77, 2009.

FORTES-DIAS, C.L.; JANNOTTI, M.L.; FRANCO, F.J.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C.R. Studies on the specificity of CNF, a phospholipase A₂ inhibitor isolated from the blood plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). I. Interaction with PLA₂ from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, v.37, p. 1747-1759, 1999.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J.L.C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2.ed. São Paulo: Savier, 2009. p.81-95.

FULY, A.L.; FRANCISCHETTI, I.M.; ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R. Partial purification and some physicochemical properties of phospholipases A₂ from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.26, p.459-463, 1993.

FULY A.L.; MACHADO, O.L.T.; ALVES, E.W.; CARLINI, C.R.S. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A₂ isolated from the venom of *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Thrombosis and Haemostasis**, v.78, p.1372-1380, 1997.

FULY, A.L.; CALIL-ELIAS, S.; ZINGALI, R.B.; GUIMARÃES, J.A.; MELO, P.A., Myotoxic activity of na acidic phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Toxicon**, v.38, p.961-972, 2000.

FULY, A.L.; DE MIRANDA, A.L.P.; ZINGALI, R.B.; GUIMARÃES, J.A. Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, v.63, p.1589-1597, 2002.

FULY, A.L.; CALIL-ELIAS, S.; MARTINEZ, A.M.B.; MELO, P.A.M.; GUIMARÃES, J.A. Myotoxicity induced by an acid Asp49 phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* snake venom. Comparison with lysophosphatidylcoline. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.35, p.1470-1481, 2003.

FULY, A.L.; SOARES, A.M.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; GUIMARÃES, J.A. Signal Transduction Pathways in the Platelet Aggregation induced by a D-49 Phospholipase A₂ Isolated From *Bothrops jararacussu* Snake Venom. **Biochimie**, v.86, p. 731-739, 2004.

GARCIA-DENEGRI, M.E.; ACOSTA, O.C.; HUANCAHUIRE-VEJA, S.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S.; MARUÑAK, S.L.; TEIBLER, G.P.; LEIVA, L.C.; PONCE-SOTO, L.A. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA(2) Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. **Toxicon**, v.56, p.64-74, 2010.

GOPALAKRISHNAKONE, P. Myotoxic phospholipases from snake venoms: general myoglobinuric and local myonecrotic toxins. **Toxicon**, v.35, p.474-474, 1997.

GOUET, P.; COURCELLE, E; STUART, D.I.; METOZ, F. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, v.15, p.305-308, 1999.

GRAMINHO, E.R.; DA SILVA, R.R.; CABRAL, T.P.F.; ARANTES, E.C.; DA ROSA, N.G.; JULIANO, L.; OKAMOTO, D.N.; GONÇALVES, L.C.; KONDO, M.Y.K.; JULIANO, M.A.; CABRAL, H. Purification, Characterization, and Specificity Determination of a New Serine Protease Secreted by *Penicillium waksmani*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 201-214, 2012.

GRAHAM, R.L.; GRAHAM, C.; MCCLEAN, S.; CHEN, T.; O'ROURKE, M.; HIST, D.; THEAKSTON, D.; SHAW, C. Identification and functional analysis of a novel bradykinin inhibitory peptide in the venoms of New World Crotalinae pit vipers. **Biochemical and Biophysical Research Community**, v.338, p.1587-1592, 2005.

GUTIÉRREZ, J.M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. Alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v.26, p.411-413, 1988.

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

GUTIÉRREZ, J.M.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A₂: Comparison between crotoxin, crotoxin B and Lys49 PLA₂ homologue. **Toxicon**, v.51, p. 80-92, 2008.

HARVEY, A.L. OVERVIEW. In: LIMA, M.E.de et al. **Animal Toxins: State of the Art; Perspectives in Health and Biotechnology**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2009. p. 19-22.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J.W. **Clinical chemistry: principles and technics**. 2.ed. New York, Harper & Row, 1974.

JABEEN, T.; SINGH, N.; SINGH, R.K.; JASTI, J.; SHARMA, S.; KAUR, P.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T.P. Crystal structure of a heterodimer of phospholipase A₂ from *Naja naja sagittifera* at 2.3 Å resolution reveals the presence of a new PLA₂-like protein with a novel cys 32-Cys 49 disulphide bridge with a bound sugar at the substrate binding site. **Proteins**, v.62, p. 329–337, 2006.

JASTI, J.; PARAMASIVAM, M.; SRINIVASAN, A.; SINGH T.P. Structure of an acidic phospholipase A₂ from Indian saw-scaled viper (*Echis carinatus*) at 2.6 Å resolution reveals a novel intermolecular interaction. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v.60, p.66–72, 2004.

JIMENEZ, K.L.; ZAVALETA, A.I.; IZAGUIRRE, V.L.; YARLEQUE A. Cloning and molecular characterization of a phospholipase A₂ cDNA from *Lachesis muta* venom gland. Submitted (JUN-2009) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

JORGE, M.T.; SANO-MARTINS, I.S.; TOMY, S.C.; CASTRO, S.C.; FERRARI, R. A.; RIBEIRO, L. A.; WARRELL, D. A. Snakebite by the bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: case report and review of the literature. **Toxicon**, v.35, p.545-554, 1997.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO L.L.; CHING A.T.; CARVALHO E.; FARIA F.; NISHIYAMA MY J.R.; HO P.L.; DINIZ M.R. *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: implications for snake toxin repertoire evolution. **Genetics**, v. 173, p. 877-889, 2006.

KANG, T.S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M.T.; SINHA, M.; KUMAR, R.P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R.K.; SINGH, T.P.; KINI, R.M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS journal**, v.278, p.4544-4576, 2011.

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.

KHAN, M.A. **Snake venom PLA₂ bioinformatic approach**. Tese, Singapore: National University of Singapore, 2002.

KINI, R.M.; IWANAGA, S. Structure-function relationships of phospholipases. II. Charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. **Toxicon**, v.24, p.895–905, 1986.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A₂. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.1402-1407, 1987.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. A Model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, v.27, p.613-635, 1989.

KINI, R.M. Venom phospholipase A₂ enzymes, Structure, Function and Mechanisms. **Wiley**, 1997.

KINI, R.M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v.45, p.1147-1161, 2005.

KINI, R.M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochemical Journal**, v.397, p.377-387, 2006.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v.68-69, p.3-58, ago. 2002.

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

LANDUCCI, E.C.T.; CONDINO-NETO, A.; PEREZ, A.C.; HYSLOP, S.; CORRADO, A.P.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Crotoxin induces aggregation of human washed platelets. **Toxicon**, v.32, p.217-226, 1994.

LEHNINGER, A.L. **Bioquímica: enzimas**. São Paulo: Edgar Blücher, 1976, p. 90-211.

LEITE, R.S. Atividade fosfolipásica de toxinas. In: SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; SOUZA, D.H.F. **Métodos em Toxinologia: toxinas de serpentes**. São Carlos: EduFSCar, 2007. p. 53-60.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDEROÓN, 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.

MADRIGAL, M.; SANZ, L.; FLORES-DÍAZ, M.; SASA, M.; NUÑEZ, V.; ALAPE-GIRÓN, A. CALVETE, J. J. Snake venomomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. **Proteomics**, v.77, p.280-297, 2012.

MAGALHÃES, H.P.B.; MAGALHÃES, A.; JULIANO, L.; NELSON, D.L.; ROGANA, E. Mechanism of action and determination of the best substrate for a thrombin like enzyme from *Lachesis muta muta* venom by regression analysis of the kinetic parameters determined with peptidyl p nitroanilide substrates. **Toxicon**, v.47, p.453-458, 2006.

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

MARQUES, M.M.A.; HERING, S.; CUPO, P. Acidente crotálico. In: CARDOSO, J.L.C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2.ed. São Paulo: Savier, 2009. p. 96-101.

MELGAREJO, A.R. Serpentes Peçonhentas no Brasil. In : CARDOSO, J.L.C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2.ed. São Paulo: Savier, 2009. p.42-70.

MODESTO, J.C.A.; SPENCER, P.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R.C.; OLIVA, M.L.; DA SILVA, M.B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; GUARNIERI, M.V.; 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. **Biochemical Pharmacology**, v.72, p.377-384, 2006.

NAOUM, P.C. **Eletroforese: técnicas e diagnósticos**. São Paulo, Santos, 1990, p. 18-24.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. Ed. Savier, 3ª Ed., 2002 – SP.

NEVALAINEIN, T.J.; GRAHAM, G.G.; SCOTT, K.F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂. Review. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1781, p.1-9, 2008.

NISEBOM, 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, 1986.

OTERO R.; FURTADO M.F.D.; GONÇALVES R.C.; NÚÑEZ V.; GARCÍA M.E.; OSORIO R.G.; ROMERO, M.; GUTIERREZ, J.M. Comparative study of the venoms of three subspecies of *Lachesis muta* (bushmaster) from Brazil, Colombia and Costa Rica. **Toxicon** v.36, p.2021-2027, 1998.

OUYANG, C.; HUANG, T. Effect of the purified phospholipases A₂ from snake and bee venoms on rabbit platelet function. **Toxicon**, v.22, p.705-718, 1984.

PARDAL, P.P.O.; BEZERRA, I.S.; RODRIGUES, L.S.R.; PARDAL, J.S.O.; de FARIAS, P.H.S. Acidente por surucucu (*Lachesis muta muta*) em Belém-Para: A case report. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, p.37-42, 2007.

PETROVIC, N.; GROVE, C.; LANGTON, P.E.; MISSO, N.L.A.; THOMPSON, P.J. A simple assay for a human serum phospholipase A₂ that is associated with high-density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.42, p.1706-1713, 2001.

PONCE-SOTO, L.A.; TOYAMA, M.H.; HYSLOP, S.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **Journal of Protein Chemistry**, v.21, p.131-136, 2002.

PUNGERCAR, J., KRIZAJ, I. LIANG, N.S.; GUBENSEK, F. An aromatic, but not a basic, residue is involved in the toxicity of group-II phospholipase A₂ neurotoxins. **Biochemistry. J.** v. 341, p.139–45, 1999.

RODRIGUES, R.S.; IZIDORO, L.F.M.; TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SELISTRE-DE-ARAÚJUO, H.S.; GIGLIO, J.R.; FULY, A.L.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Isolation and functional characterization of a new phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v.50, p.153-165, 2007.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; DE OLIVEIRA JR., ROBSON J.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, ANDREIMAR M.; RODRIGUES, V.M. Snake Venom Phospholipases A₂: A New Class of Antitumor Agents. *Protein and Peptide Letters*, v.16, p.894-898, 2009.

RODRIGUES, R.S. **Análise do perfil de expressão gênica da glândula de peçonha de *Bothrops pauloensis* (*Bothropoides pauloensis*)**. 2010. 134f. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, Minas Gerais.

RUCAVADO, A.; SÁNCHEZ, E.F.; FRANCESCHI, A.; MAGALHAES, A.; GUTIERREZ, J.M. Characterization of the local tissue damage induced by LHF- II, a metalloproteinase with

weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, v.37, p. 1297-1312, 1999.

SANTOS-FILHO, N.A.; SILVEIRA, L.B.; OLIVEIRA, C.Z.; BERNARDES, C.P.; MENALDO, D.L.; FULY, A.L.; ARANTES, E.C.; SAMPAIO, S.V.; MAMEDE, C.C.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A.M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolates from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v.52, p.908-917, 2008.

SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FERRETTI, M.; BISCOGLIO, M.J.; RIVERA E.; CRESCENTI, E.J.; RIVERA, E.; BISCOGLIO, M.J.; FERRETTI M.; ESCOLANO J.; CALVETE J.J. Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. **Journal of Proteomics**, v.71, p.46-60, 2008.

SCHAGGER, H.; von JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v.166, p.368-379, 1987.

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica and Biophysica 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.

SCOPES, R.K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. **Analytical Biochemistry**, v.59, p.277-282, 1974.

SILVA, C.B. **Caracterização bioquímica, estrutural e funcional de uma L-aminoácido oxidase isolada de peçonha de *Lachesis muta* (Serpentes, Viperidae)**. 2011. 145f. Tese (doutorado em ciências). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

SILVA JR, N.J.; BUCARETCHI, F. Mecanismo de Ação do Veneno Elapídico e Aspectos Clínicos dos Acidentes. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J.L.C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2.ed. São Paulo: Savier, 2009. p. 100-107.

SILVEIRA, L.B. **Caracterização funcional e estrutural de uma nova fosfolipase A₂ ácida de *Bothrops moojeni***. 2011. 100f. Tese (doutorado em ciências). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

SINGH G.; JASTI J.; SARAVANAN K.; SHARMA S.; KAUR P.; SRINIVASAN A.; SINGH T.P. Crystal structure of the complex formed between a group I phospholipase A₂ and a naturally occurring fatty acid at 2.7 Å resolution. **Protein Science**, v.14, p. 395–400, 2005.

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. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.387, p.188–96, 2001a.

SOARES, A.M.; MANCINI A.C.; CECCHINI, A. L.; ARANTES, E.C. FRANÇA, S.C.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A₂ subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, 2001b.

SOARES DE MOURA, R.; AGUIAR, A.S.; MELGAREJO, A.R.; CARVALHO, L.C.R.M. Pharmacological profile of mouse hind-paw edema induced by *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon**, v.36, p.771–780, 1998.

STÁBELI, R.G.; AMUI, S.F.; SANT'ANA, C.D.; PIRES, M.G.; NOMIZIO, A.; MONTEIRO, M.C.; ROMÃO, P.R.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.; SOARES, A.M. *Bothrops moojeni* myotoxin-I, a Lys-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 142, p. 371-381, 2006.

STILES, B. G.; SEXTON, F.W.; WEINSTEIN, S.A. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**, v.29, p. 1129-1141, 1991.

TAKASAKI, J.; KAWAUCHI, Y.; URASAKI, T.; TANAKA, H.; USUDA, S.; MASUHO, Y. Antibodies against type II phospholipase A₂ prevent renal injury due to ischemia and reperfusion in rats. **FEBS Letters**, v.440, p.377-381, 1998.

TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; DA SILVA, F.M.N.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; SILVA JR, F.P.; IZIDORO, L.F.M.; FULY, A.L.; JULIANO, M.A.; DOS SANTOS, C.R.; MURAKAMI, M.T.; SAMPAIO, S.V.; DA SILVA, S.L.; SOARES, A.M. Molecular characterization of an acid phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. **Archives of Toxicology**, v.85, p.1219-1233, 2011.

VARANDA, E.A.; GIANNINI, M.J.S.M. Bioquímica de Venenos de Serpentes. In: BARRAVIERA, B. **Venenos: Aspectos Clínicos e Terapêuticos dos Acidentes por Animais Peçonhentos**. Rio de Janeiro: EPUB, 1999. p. 205-223.

VERHEIJ, H.M.; VOLWERK, J.J.; JASEN, 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.

VISHWANATH, B.S.; KINI, R.M.; GOWDA, T.V. Characterization of three edema-inducing phospholipase A₂ enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid*. **Toxicon**, v.25, p.501-515, 1987.

VISHWANATH, B.S.; KINI, R.M.; GOWDA, T.V. Purification and partial biochemical characterization of an edema inducing phospholipase A₂ from *Vipera russelli* (russel's viper) snake venom. **Toxicon**, v.26, p.713-720, 1988.

XU, S.; GU, L.; WANG, Q.; SHU, Y.; SONG, S.; LIN, Z. Structure of a king cobra phospholipase A₂ determined from a hemihedrally twinned crystal. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v.59, p.1574–1581, 2003.

WAINAINA M.N.; SHIBATA T.; SMANMOO C.; KABASHIMA T.; KAI M. Fluorescence detection of amino acids in the postcleavage conversions for manual sequencing of a peptide. **Analytical Biochemistry**, v.374, p.423-425, 2008.

WATKINS, J.B. PROPERTIES AND TOXICITIES OF ANIMAL VENOMS. In: KLAASSEN, C.D. **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 7.ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 2008. p.1083-1102.

WEISS, J.; INADA, M.; ELSBACH, P.; CROWL, R.M. Structural determinants of the action against *Escherichia coli* of a human inflammatory fluid phospholipase A₂ in concert with polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.26331–2637, 1994.

YEDGAR, S.; LICHTENBERG, D.; SCHNITZER, E. Inhibition of phospholipase A₂ as a therapeutic target. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1488, p. 182-187, 2000.

ZAMUDIO, K.R.; GREENE, H.W. Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.62, p 421-442, 1997.

ZULIANI, P.J.; FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; GUTIERREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v.45, p. 335-346, 2005.

