



JOSÉ MIGUEL ROJAS HUALPA

**“FOSFOLIPASES A₂ BanTX-I E BanTX-II PURIFICADAS A PARTIR
DO VENENO DE *Bothrops andianus*: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MIOTÓXICA E
INFLAMATÓRIA”**

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



JOSÉ MIGUEL ROJAS HUALPA

**“FOSFOLIPASES A₂ BanTX-I E BanTX-II PURIFICADAS A PARTIR
DO VENENO DE *Bothrops andianus*: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MIOTÓXICA E
INFLAMATÓRIA”**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do Título de Mestre em Biologia
Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Marangoni

Co-Orientador: Prof. Dr. Luis Alberto Ponce Soto

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO
JOSÉ MIGUEL ROJAS HUALPA, E ORIENTADA
PELO PROF. DR. SERGIO MARANGONI

Campinas

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R638f Rojas-Hualpa, José Miguel, 1985-
Fosfolipases A₂ BanTX-I e BanTX-II purificadas a partir do veneno de *Bothrops andianus* : caracterização físico-química e avaliação das atividades miotóxica e inflamatória / José Miguel Rojas Hualpa. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Sergio Marangoni.

Coorientador: Luis Alberto Ponce Soto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fosfolipase A₂. 2. *Bothrops andianus*. 3. Veneno - Purificação. I. Marangoni, Sergio, 1951-. II. Ponce-Soto, Luis Alberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Phospholipase A₂ BanTX-I and BanTX-II purified from the venom of *Bothrops andianus* : physico-chemistry characterization and evaluation of myotoxic and inflammatory activities

Palavras-chave em inglês:

Phospholipase A₂

Bothrops andianus

Venom - Purification

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Sergio Marangoni [Orientador]

Luciana Maria de Hollanda

Thalita Rocha

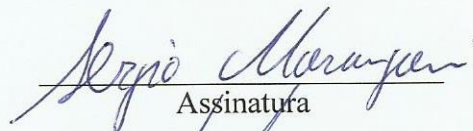
Data de defesa: 17-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 17 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

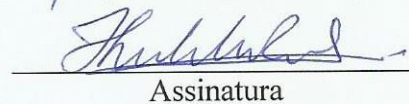
Prof. Dr. Sergio Marangoni (orientador)


Assinatura

Dra. Luciana Maria de Hollanda


Assinatura

Profa. Dra. Thalita Rocha


Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Dr. Daniel Henrique do Amaral Corrêa

Assinatura

Resumo

No presente trabalho, foram purificadas e caracterizadas físico-química e farmacologicamente duas toxinas PLA₂: a BanTX-I (PLA₂ homóloga K49) e a BanTX-II (PLA₂ D49), a partir do veneno de *Bothrops andianus*. As duas proteínas foram purificadas em duas etapas cromatográficas, primeiro por exclusão molecular em Sephadex G-75 e depois por HPLC-RP (C18). A eletroforese SDS-PAGE de ambas toxinas mostrou massas relativas ~28 e ~14 kDa (para dímeros e monômeros, respectivamente). A espectrometria de massa por electrospray (ESI-QTOF-MS/MS) confirmou a pureza das proteínas e mostrou que possuem massas moleculares de 13712 Da (BanTX-I) e 13693 Da (BanTX-II). A caracterização da estrutura primária, através do processamento dos produtos trípticos usando a espectrometria de massa por electrospray (ESI-QTOF-MS/MS), evidenciou que a sequência de aminoácidos deduzida da BanTX-I mostra alta identidade (83 - 97 %) com outras PLA₂ homólogas K49, além da falta de atividade PLA₂, característico deste grupo. De outro lado, a BanTX-II evidenciou identidade entre 60 - 69 % com outras PLA₂, e apresentou atividade PLA₂ na presença do substrato cromogênico NOAB, mostrando comportamento sigmoidal, principalmente em baixas concentrações. A atividade máxima alcançada foi com pH 8 e entre 35 - 40°C. Também, mostrou-se completamente dependente de Ca²⁺ e, na presença dos íons Mg²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺ e Zn²⁺, a atividade enzimática foi reduzida notavelmente. A BanTX-I e a BanTX-II mostraram ser miotoxinas, com atividade inflamatória independentemente da atividade catalítica para a BanTX-I. Os testes *in vivo* do veneno total, a BanTX-I e a BanTX-II demonstraram o efeito miotóxico através da liberação de creatina quinase (CK) e o efeito inflamatório através de edema de pata em camundongo.

Palavras chave: Veneno serpente, fosfolipase A₂, PLA₂, Asp49, Lys49, *Bothrops andianus*

Abstract

In this work, were purified and characterized physicochemical and pharmacologically two toxins PLA₂: BanTX-I (PLA₂ homologue K49) and BanTX-II (PLA₂ D49) from the venom of *Bothrops andianus*. The two proteins were purified in two chromatographic steps, first by molecular exclusion Sephadex G-75 and then by RP-HPLC (C18). SDS-PAGE electrophoresis of both toxins showed relative masses ~28 and ~14 kDa (for dimers and monomers, respectively). Electrospray mass spectrometry (ESI-QTOF-MS/MS) confirmed the purity of proteins and showed that have molecular masses of 13712 Da (BanTX-I) and 13693 Da (BanTX-II). Characterization of the primary structure, by processing the tryptic products using electrospray mass spectrometry (ESI-QTOF-MS/MS), showed that the deduced amino acid sequence of BanTX-I shows strong identity (83 - 97 %) with other PLA₂ homologues K49, and the lack of PLA₂ activity, characteristic of this group. On the other hand, BanTX-II showed identity between 60 - 69 % with others PLA₂, and showed PLA₂ activity in presence of the chromogenic substrate NOAB, showing sigmoidal behavior, especially at low concentrations. The maximum activity was achieved at pH 8 and between 35 - 40°C. Also proved to be completely dependent on Ca²⁺ and, in presence of ions Mg²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺ and Zn²⁺, the enzyme activity was reduced remarkably. BanTX-I and BanTX-II showed be myotoxins with inflammatory activity independently of catalytic activity for BanTX-I. *In vivo* tests of the whole venom, BanTX-I and BanTX-II showed the myotoxic effect through the release of creatine kinase (CK) and the inflammatory effect through paw edema in mice.

Keywords: Venom snake, phospholipase A₂, PLA₂, Asp49, Lys49, *Bothrops andianus*

Sumário

	Pág.
Lista de Ilustrações.....	xvii
Lista de Tabelas.....	xix
Lista de Abreviações.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Veneno de serpente.....	01
1.2. Veneno botrópico.....	02
1.2.1. Atividade miotóxica.....	03
1.2.2. Atividade inflamatória.....	04
1.2.3. Atividade hemorrágica.....	05
1.3. Fosfolipase A ₂ (PLA ₂).....	05
1.3.1. Estrutura e função das PLA ₂	07
1.3.2. Ação biológica das PLA ₂	11
1.3.3. Miotoxinas PLA ₂	12
1.4. <i>Bothrops andianus</i>	13
1.4.1. Descrição.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Veneno e reagentes.....	16
3.2. Animais.....	16
3.3. Purificação de miotoxinas PLA ₂ a partir do veneno total de <i>B. andianus</i>	16
3.3.1. Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75.....	16
3.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC-RP).....	16
3.3.3. Atividade específica, recuperação e grau de pureza.....	17
3.4. Determinação da massa molecular.....	17
3.4.1. Eletroforese em SDS-PAGE.....	17
3.4.2. Espectrometria de massa por electrospray (ESI).....	18
3.5. Caracterização da estrutura primária.....	18
3.5.1. Redução e alquilação.....	18
3.5.2. Hidrólise enzimática.....	19
3.5.3. Procesamento dos produtos trípticos.....	19
3.6. Atividade PLA ₂	19
3.7. Estudos dos fatores que afetam a velocidade de reação da PLA ₂	20
3.7.1. Efeito da concentração do substrato na atividade PLA ₂	20
3.7.2. Efeito do pH na atividade PLA ₂	20
3.7.3. Efeito da temperatura na atividade PLA ₂	20
3.7.4. Efeito de íons divalentes na atividade PLA ₂	20
3.8. Avaliação das atividades farmacológicas de PLA ₂	21

3.8.1.	Atividade miotóxica através do nível de CK plasmático em camundongos.....	21
a.	Atividade miotóxica local <i>in vivo</i>	21
b.	Atividade miotóxica sistêmica <i>in vivo</i>	21
3.8.2.	Atividade inflamatória em camundongos (edema de pata).....	22
3.9.	Análise estatística.....	22
4.	RESULTADOS.....	23
4.1.	Purificação das PLA ₂ BanTX-I e BanTX-II a partir do veneno total de <i>B. andianus</i>	23
4.1.1.	Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75.....	23
4.1.2.	Atividade PLA ₂ das frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular.....	24
4.1.3.	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC-RP).....	24
4.1.4.	Atividade PLA ₂ das frações obtidas por HPLC-RP.....	25
4.1.5.	Atividade específica, recuperação e grau de pureza.....	26
4.2.	Determinação da massa molecular de BanTX-I e BanTX-II.....	27
4.2.1.	Eletroforese em SDS-PAGE.....	27
4.2.2.	Espectrometria de massa por electrospray (ESI).....	27
4.3.	Caracterização da estrutura primária da PLA ₂ homóloga K49 e PLA ₂	29
4.3.1.	PLA ₂ homóloga K49 (BanTX-I).....	29
4.3.2.	PLA ₂ D49 (BanTX-II).....	31
4.4.	Fatores que afetam a velocidade de reação da PLA ₂ BanTX-II.....	35
4.5.	Avaliação das atividades farmacológicas.....	36
4.5.1.	Atividade miotóxica através do nível de CK plasmático em camundongos.....	36
a.	Atividade miotóxica local <i>in vivo</i>	36
b.	Atividade miotóxica sistêmica <i>in vivo</i>	36
4.5.2.	Atividade inflamatória em camundongos (edema de pata).....	37
5.	DISCUSSÃO.....	38
6.	CONCLUSÕES.....	47
7.	BIBLIOGRAFIA.....	48
8.	ANEXO.....	56

Dedicatória

Dedico esta tese, com satisfação e alegria

A minha família...

Por eles eu sou o que sou. Aos meus pais por seu apoio, orientação, compreensão, amor, ajuda nos momentos difíceis, e por me ajudar com os recursos necessários para estudar. Eles deram-me tudo o que eu sou como pessoa, meus valores, meus princípios, meu caráter, meu compromisso, minha perseverança, para conseguir meus objetivos. Aos meus queridos companheiros, que me apoiaram e me permitiram entrar na suas vidas durante estes quase 2 anos de conviver no laboratório LAQUIP e aos meus professores do mestrado por seus conselhos.

Agradecimentos

[

Meus agradecimentos ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Marangoni, pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório, pela orientação e principalmente pelo bom convívio nestes dois anos de trabalho. Consegui enriquecer meu conhecimento, com suas argumentações científicas e sugestões nos meus projetos, relatórios, teses, entre outros.

Agradeço ao meu coorientador Prof. Dr. Luis Alberto Ponce Soto, pela amizade, confiança e incentivo durante todo esse tempo, pelas sugestões e discussões do trabalho. Sou grato pelos ensinamentos de vida e científicos transmitidos.

Aos professores da banca e pré-banca Profa. Dra. Luciana Maria de Hollanda, Profa. Dra. Thalita Rocha, Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck e Prof. Dr. Daniel Henrique do Amaral, por terem aceitado a participar da avaliação e por contribuírem com a melhora deste trabalho.

A todos os professores que ensinam no Departamento de Bioquímica, socializando o conhecimento, a minha gratidão

A Romênia Ramos Domingues do Laboratório Nacional de Biociências, pela colaboração nos ensaios de espectrometria de massa.

Ao Paulo Baldasso, um agradecimento especial, pela amizade e ajuda fundamental nos experimentos realizados durante o projeto de pesquisa.

Aos colegas do laboratório: Rafael, Letícia, Miriam, Víctor, Caio, Desiree, Salomon, Augusto e Frank, pela alegre convivência e sugestões no desenvolvimento deste trabalho. A vocês muito obrigado!

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo que possibilitou a realização desta tese.

Lista de Ilustrações

	Pág.
Fig. 1. Consequências da picada de serpentes botrópicas.....	02
Fig. 2. Hipótese sobre o desenvolvimento dos efeitos locais induzidos por venenos botrópicos.....	03
Fig. 3. Local de hidrólise de diferentes fosfolipases.....	05
Fig. 4. Representação em fita de uma PLA ₂ anticoagulante classe II do veneno de <i>Vipera russelli russelli</i>	08
Fig. 5. Representação de bola e bastão da alça de ligação ao íon cálcio.....	09
Fig. 6. Representação esquemática do mecanismo catalítico da PLA ₂	10
Fig. 7. Hipótese do mecanismo de ação das fosfolipases A ₂ miotóxicas do veneno de <i>Bothrops</i> sp.....	13
Fig. 8. Serpente <i>Bothrops andianus</i>	14
Fig. 9. Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75 do veneno <i>B. andianus</i>	23
Fig. 10. Atividade PLA ₂ do veneno total e das frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular.....	24
Fig. 11. Perfil cromatográfico por HPLC-RP da fração III obtida por exclusão molecular.....	25
Fig. 12. Atividade PLA ₂ das frações obtidas por HPLC-RP.....	25
Fig. 13. Re-cromatografia das frações BanTX-I (A) e BanTX-II (B) em HPLC-RP.....	26
Fig. 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %) SDS-PAGE.....	27
Fig. 15. Deconvolução do espectro e espectros de massa crus (insertos) da BanTX-I (A) e BanTX-II.....	28
Fig. 16. Espectro ESI-QTOF-MS/MS mostrando as series de íons <i>b</i> e <i>y</i> do quinto peptídeo da BanTX-I.....	30
Fig. 17. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida de BanTX-I com outras PLA ₂ K49.....	31
Fig. 18. Espectro ESI-QTOF-MS/MS mostrando as series de íons <i>b</i> e <i>y</i> do quarto peptídeo da BanTX-II.....	32
Fig. 19. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida de BanTX-II com outras PLA ₂ D49.....	34
Fig. 20. Estudos cinéticos da atividade PLA ₂ da BanTX-II.....	35
Fig. 21. Atividade miotóxica local do veneno total e das toxinas BanTX-I e BanTX-II.....	36
Fig. 22. Atividade miotóxica sistêmica do veneno e das toxinas BanTX-I e BanTX-II.....	37
Fig. 23. Atividade inflamatória em camundongos (edema de pata) do VT, BanTX-I e BanTX-II.....	37

Lista de Tabelas

	Pág.
Tabela 1. Fosfolipases A ₂ secretórias (sPLA ₂).....	07
Tabela 2. Efeitos farmacológicos das enzimas PLA ₂ de veneno.....	11
Tabela 3. Atividade específica e recuperação de BanTX-II obtida por HPLC-RP.....	26
Tabela 4. Massas e sequências de aminoácidos ESI-QToF-MS/MS dos peptídeos trípticos de BanTX-I.....	29
Tabela 5. Valores da série <i>b</i> e <i>y</i> do quinto peptídeo (resíduos 41 - 46) da BanTX-I.....	30
Tabela 6. Massas e sequências de aminoácidos ESI-QToF-MS/MS dos peptídeos trípticos da BanTX-II.....	32
Tabela 7. Valores da série <i>b</i> e <i>y</i> do quarto peptídeo (resíduos 43 - 53) da BanTX-II.....	33

Lista de Abreviações

PAF-AH	Acetilhidrolase ativadora de plaquetas
TFA	Ácido trifluoroacético
(NH ₄)HCO ₃	Bicarbonato de amônio
CK	Creatina quinase
HPLC-RP	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
DTT	Ditiotreitol
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de poliacrilamida - Dodecil Sulfato de Sódio
ESI-QTOF-MS/MS	Espectrometria de massa em tandem quadrupole-tempo de voo eletrospray
PLA ₂ D49	Fosfolipase A ₂ Aspartato 49
PLA ₂ K49	Fosfolipase A ₂ Lisina 49
AdPLA ₂	Fosfolipase A ₂ adiposa
iPLA ₂	Fosfolipase A ₂ Ca ²⁺ -independente
cPLA ₂	Fosfolipase A ₂ citosólica
sPLA ₂	Fosfolipase A ₂ secretória
PLC / PLD	Fosfolipase C / Fosfolipase D
ESI	Ionização por Electrospray
Mr	Massa relativa
C18	Sílica com cadeias hidrocarbonadas de 18 carbonos
NOAB	Substrato cromogênico ácido 4-nitro-(3-octanoiloxi) benzóico
BanTX-I	Toxina PLA ₂ I de <i>B. andianus</i>
BanTX-II	Toxina PLA ₂ II de <i>B. andianus</i>
VT	Veneno total

Aminoácidos

Nome do aminoácido	Abreviação	Símbolo
Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Glutamato/Glutamina	Glx	Z
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

1. INTRODUÇÃO

O envenenamento por picada de serpente é um problema de saúde pública global, que afeta principalmente regiões como África, Ásia, América Latina e Papua-Nova Guiné (Gutiérrez *et al.*, 2010). Recentemente, foi incluída pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na lista de doenças negligenciadas (World Health Organization, 2007).

Segundo Kasturiratne *et al.* (2008), a estimativa global é que ocorram pelo menos 421,000 casos de envenenamento e 20,000 mortes cada ano devido à picada de serpente. Atualmente o único tratamento específico é a administração do antiveneno que, embora tenha reduzido a mortalidade, devido à neutralização das toxinas que agem sistemicamente, muitas vezes é ineficiente na reversão dos danos teciduais locais. Portanto, para melhorar a qualidade dos antivenenos precisa-se do uso de toxinas relevantes purificadas ao invés do veneno total (Gutiérrez *et al.*, 2006).

1.1. Veneno de serpente

O veneno de serpente é uma “biblioteca” de moléculas de natureza química diversa como proteínas, nucleotídeos, íons inorgânicos (cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco), carboidratos (glicoproteínas), lipídeos (fosfolipídios) e aminas biogênicas (tipo histamina). Não obstante, a maior parte desses compostos presentes no veneno de serpente é formada por proteínas e peptídeos (90 - 95 %), que são responsáveis pela ampla variedade de propriedades tóxicas deste (Markland, 1998; Koh *et al.*, 2006).

Entre as proteínas estão as chamadas proteases, que apresentam atividade enzimática, tendo como alvo as proteínas da presa. As proteases são classificadas em metaloproteases e serinoproteases. Outros tipos de proteínas encontrados são: fosfolipases A₂, fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, L-amino oxidases, catalases, ATPases, hialuronidases, NAD nucleosidases, e β -glicosaminidases (Matsui *et al.*, 2000). Todos esses componentes individuais, têm grande potencial como agentes terapêuticos para doenças humanas (por exemplo, o câncer) (Koh *et al.*, 2006).

1.2. Veneno Botrópico

O veneno de serpente do género *Bothrops* sp., apresenta uma fisiopatologia complexa, com efeitos locais (miotoxicidade, hemorragia, paralisia neuromotora, edema, hiperalgesia e dermonecrose) e alterações sistêmicas (coagulopatias, sangria, choque cardiovascular e insuficiência renal aguda) (Ponce-Soto *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2003) (Figura 1). Essas atividades podem ser devidas a uma única toxina com várias atividades farmacológicas (Ponce-Soto *et al.*, 2006) ou diferentes toxinas podem atuar de forma complementar ou sinérgica (Bustillo *et al.*, 2012).

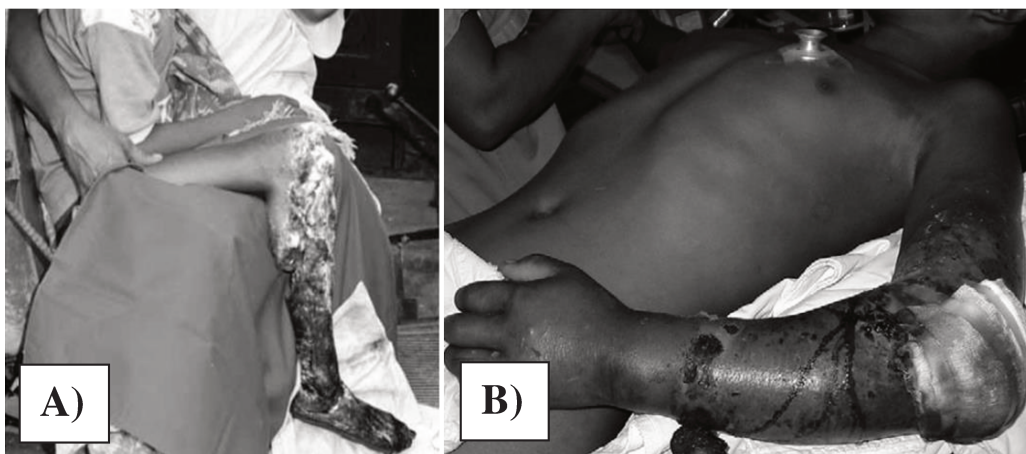


Fig. 1. Consequências da picada de serpentes botrópicas. A) Gangrena e necrose do membro inferior em um menino de 11 anos que tinha sido picado duas semanas antes por uma *Bothrops asper* no Equador (Gutiérrez *et al.*, 2006). B) Hemorragia e edema do membro superior em um menino de 12 anos que foi picado por uma *Bothrops atrox* de 1,5 m de comprimento em uma área remota de Ucayali-Peru. O posto de saúde não tinha antiveneno e ele viajou com a sua mãe de barco por 24 h até um segundo posto, no qual também faltava antiveneno. Ele finalmente alcançou um hospital 48 h depois de ser picado mas, apesar da hemorragia, ele rejeito o antiveneno em razão de ter sido tarde demais. Finalmente, ele foi transferido a um hospital regional 13 dias após a picada onde seu braço gangrenado foi amputado (Gutiérrez *et al.*, 2010).

Os efeitos locais induzidos por venenos botrópicos, constituem um problema relevante porque atuam rapidamente, após a inoculação do veneno, o que dificulta a sua neutralização, se o soro antiofídico seja administrado várias horas após o acidente ofídico (Gutiérrez *et al.*, 2010). Os venenos botrópicos afetam drasticamente o tecido muscular, os vasos sanguíneos e a pele, induzindo lesões que, com frequência, deixam sequelas. Frequentemente se complicam com infecções, o que dificulta ainda mais o manejo do quadro clínico. Em alguns casos severos, desencadeia-se uma síndrome compartimental, exigindo a cirurgia do tecido

já necrosado (fasciotomia), o que complica o tratamento e prolonga a permanência do paciente no hospital. A experiência clínica mostra que esses efeitos locais são difíceis de neutralizar pelos soros antiofídicos (Gutierrez e Lomonte, 2003) (Figura 2).

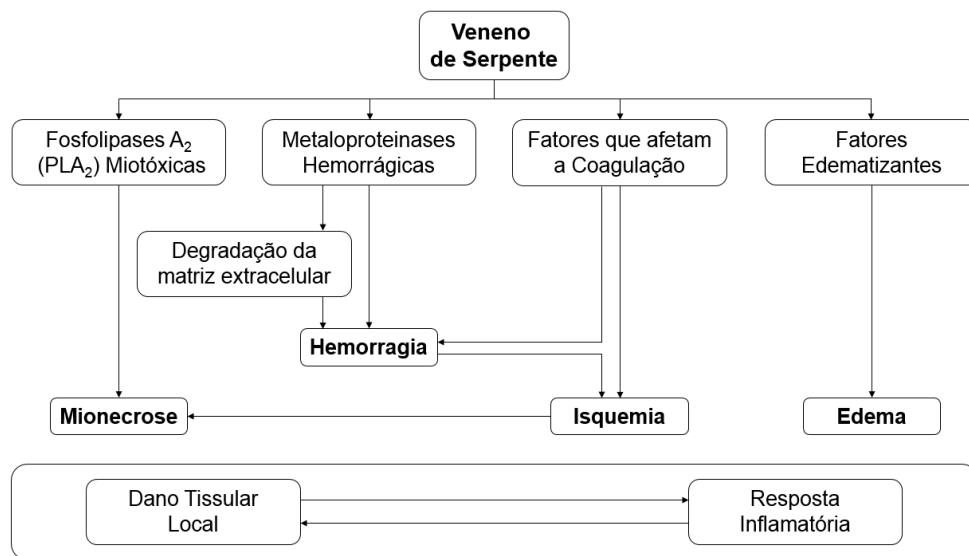


Fig. 2. Hipótese sobre o desenvolvimento dos efeitos locais induzidos por venenos botrópicos (Adaptado de Gutiérrez e Lomonte, 2003).

1.2.1. Atividade miotóxica

A miotoxicidade induzida pelo veneno de serpente apresenta dois padrões clínicos diferentes: miotoxicidade sistêmica, sendo caracterizado por dano muscular difundido, incrementos pronunciados na atividade creatina quinase plasmática (CK) e mioglobinúria, frequentemente associada com alterações renais e hipercalemia. Por outro lado, muitos venenos botrópicos induzem predominantemente miotoxicidade local, caracterizado por mionecrose na região anatômica onde o veneno é injetado, mas faltando as manifestações miotóxicas sistêmicas. Esta mionecrose local é muitas vezes associada com outros efeitos, tais como hemorragia, edema e empolamento, em um complexo padrão de dano do tecido local (Gutiérrez e Ownby, 2003). Os componentes miotóxicos são conhecidos como miotoxinas, proteínas básicas com pesos moleculares de ~14 kDa, cujas propriedades estruturais permitem classificá-las como PLA₂. Algumas apresentam atividade enzimática (PLA₂ D49), enquanto que outras não (PLA₂ homóloga K49). Ambos os tipos de fosfolipases A₂ induzem miotoxicidade em células musculares estriadas. A miotoxicidade local induzida por esses venenos tem dois mecanismos fundamentais: (1) ação direta das miotoxinas sobre

as células musculares originando lesão, e (2) isquemia que se desencadeia no tecido como consequência do sangramento, compressão tissular e outras alterações inflamatórias (Gutiérrez e Ownby, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2008; Lomonte *et al.*, 2003; Ponce-Soto *et al.*, 2007).

1.2.2. Atividade inflamatória

A atividade inflamatória ou edematogênica é potente e é evidenciada nos casos clínicos e nos modelos experimentais. É causada por diversas frações do veneno botrópico, como aminas biogênicas pré-formadas do tipo histamina, proteínas como PLA₂, esterases, proteases, enzimas liberadoras de cininas e lectinas (Teixeira *et al.*, 2003). A administração exógena de PLA₂ em animais experimentais desencadeia uma cascata de eventos inflamatórios, caracterizado pelo aumento da permeabilidade microvascular e a formação de edema, o recrutamento de leucócitos em tecidos, nocicepção e liberação de mediadores inflamatórios, os quais imitam um número de desordens inflamatórias sistêmicas e locais em humanos. Variantes PLA₂ homólogas K49 cataliticamente inativas induzem efeitos inflamatórios e nociceptivos que são qualitativamente semelhantes às PLA₂ D49, é evidente que a atividade catalítica não é estritamente necessária para desencadear estas respostas inflamatórias, embora possa contribuir para estes efeitos. É provável que outras características, tais como o conteúdo de carga catiônica e a capacidade de ativar PLA₂ citosólica endógena, desempenham um papel mais importante na promoção desses efeitos (Teixeira *et al.*, 2003).

As doses requeridas para induzir um efeito inflamatório significativo são variáveis. Em estudos experimentais com a BaTX, uma PLA₂ homóloga isolada de *Bothrops alternatus*, verificou-se que uma concentração de 2,5 µg/indivíduo é capaz de produzir edema no coxim plantar de camundongos (Ponce-Soto *et al.* 2007). Resultados similares foram observados com as PLA₂ BmTX-I de *B. moojeni*, BbTXII e III de *B. brazili* e BmjeTX-I e II de *B. marajoensis*, que com uma concentração de 10 µg/indivíduo, são capazes de produzir edema no mesmo modelo experimental (Calgarotto *et al.*, 2008; Huancahuire-Vega *et al.*, 2009; Ponce-Soto *et al.*, 2010).

1.2.3. Atividade Hemorrágica

A atividade hemorrágica é causada por toxinas denominadas hemorraginas. Estas enzimas são do tipo metaloprotease, pois sua atividade enzimática depende da presença de um átomo de zinco no seu sítio ativo (Fox e Serrano, 2009). As hemorraginas podem romper a integridade do endotélio vascular e têm atividade desintegrina, além de serem potentes inibidoras da agregação plaquetária. Várias metaloproteases de espécies botrópicas têm sido descritas e mostram efeito hemorrágico. Por exemplo, a BaP1, metaloprotease purificada do veneno de *Bothrops asper* (Rucavado *et al.*, 1995), a BjuSSuMP-I, purificada do veneno de *Bothrops jararacussu* (Mazzi *et al.*, 2004), e a HFBm, metaloprotease de *Bothrops marajoensis* (Torres-Huaco *et al.*, 2010).

1.3. Fosfolipase A₂ (PLA₂)

As fosfolipases A₂ (EC 3.1.1.4, segundo a *Enzyme Commission number*) são enzimas que catalisam especificamente a hidrólise da ligação acil-éster na posição sn-2 dos fosfolípidos em uma reação dependente de cálcio (Arni e Ward, 1996; Wilton, 2005; Magro *et al.*, 2009) (Figura 3).

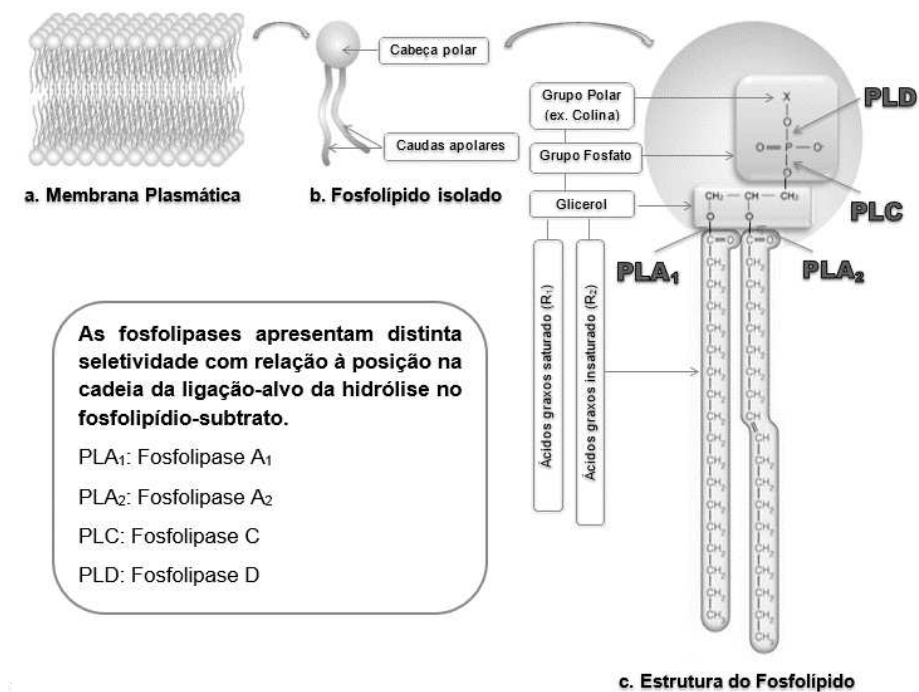


Fig. 3. Local de hidrólise de diferentes fosfolipases (adaptado de Wilton, 2005).

As PLA₂ têm papel fundamental no metabolismo de lipídeos e estão intimamente relacionadas com a liberação de ácido araquidônico, que é um precursor de lipídeos bioativos tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Estas enzimas também atuam em respostas imunológicas, inflamação, proliferação celular e vasoconstrição (Hanada *et al.*, 1995; Dennis *et al.*, 2011).

A superfamília de enzimas PLA₂ possui atualmente um grande número de proteínas diferentes, que podem ser divididas em seis tipos principais: PLA₂ secretórias (sPLA₂), PLA₂ citosólicas (cPLA₂), PLA₂ Ca²⁺-independentes (iPLA₂), acetilhidrolases ativadoras de plaquetas (PAF-AH), as PLA₂ lisossomais e PLA₂ adiposa (AdPLA₂). A atribuição das enzimas em um determinado grupo é baseado no mecanismo catalítico (His/Asp, Ser/Asp ou Ser/His/Asp hidrolase), assim como as suas características funcionais e estruturais (Dennis *et al.*, 2011).

As PLA₂ secretórias (sPLA₂) (Tabela 1), que inclui as PLA₂ de veneno de serpentes, são divididas em 14 grupos (I - XIV), de acordo como organismo fonte, a massa molecular e as pontes de sulfeto. As sPLA₂ são proteínas pequenas de 12 - 18 kDa a exceção é Grupo III sPLA₂, que são purificados a partir de humano e têm massa molecular de 55 kDa e usualmente contém 5 - 8 pontes dissulfeto. Essas enzimas têm um resíduo de histidina no sítio ativo e requerem Ca²⁺ (concentração µM) para a catálise. As PLA₂ de serpentes da família Viperidae encontram-se classificadas no grupo IIA e estão subdivididas em dois subgrupos principais: (1) PLA₂ D49, com um resíduo de Aspartato na posição 49 e alta atividade catalítica e (2) PLA₂ homóloga K49, com um resíduo de Lisina na posição 49 e pouca ou nenhuma atividade catalítica (Selistre de Araújo *et al.*, 1996; Ownby *et al.*, 1999; Wilton, 2005; Dennis *et al.*, 2011). Os dois tipos de proteínas mostram similaridade significativa em sua estrutura tridimensional, no entanto, exibem propriedades farmacológicas diferentes, tornando-se alvos interessantes para muitas pesquisas (Magro *et al.*, 2009).

Tabela 1. Fosfolipases A₂ secretórias (sPLA₂) (Adaptada de Dennis *et al.*, 2011).

Grupo	Origem	Massa molecular (kDa)	Pontes dissulfeto
IA	Cobras e Kraits	13-15	7
IB	Pâncreas humano/porcino	13-15	7
IIA	Cascavéis, sinovial humano	13-15	7
IIB	Víboras Gaboon	13-15	6
IIC	Testículo rato/murino	15	8
IID	Baço/pâncreas humano/murino	14-15	7
III	Útero/coração/cérebro humano/murino	14-15	7
IIIF	Embrião/testículo humano/murino	16-17	6
III	Lagartixa/abelha	15-18	8
	Humano/murino	55	8
V	Macrófago/pulmão/coração humano/murino	14	6
IX	Veneno de aranha (conodipine-M)	14	6
X	Leucócito/timo/baço humano	14	8
XIA	Brotos de arroz verde	12,4	6
XIB	Brotos de arroz verde	12,9	6
XII	Murino/humano	19	7
XIII	Parvovirus	<10	0
XIV	Bactérias/fungos simbioses	13-19	2

1.3.1. Estrutura e função das PLA₂

As PLA₂ de veneno de serpentes são proteínas que contêm entre 120 e 134 resíduos de aminoácidos (Scott *et al.*, 1990). A maioria dos resíduos conservados ocupam posições sensíveis estruturalmente ou participam diretamente na catálise. Os 14 resíduos de cisteína conservados formam uma rede rígida de pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura terciária (Valentin e Lambeau, 2000). Atualmente, têm sido descritas mais de trezentas enzimas PLA₂ de veneno de serpente. As enzimas PLA₂ compartilham 40 - 99 % de identidade em suas sequências de aminoácidos e, conseqüentemente, similaridade na sua estrutura tridimensional (Scott, 1997) (Figura 4). No entanto, essas diferem grandemente em suas propriedades farmacológicas (Kini, 2003).

A enzima PLA₂ é constituída por três segmentos em alfa hélice (hélices 1, 2 e 3), alças e folhas beta. Os resíduos polares do sítio catalítico (His48, Asp49, Asp99 e Tyr52)

estão situados no interior de duas α -hélices (2 e 3). A região N-terminal é representada pela α -hélice 1 (resíduos 1 - 12), em seguida está localizada uma curta hélice (resíduos 18 - 23). Entre os resíduos 25 - 34 está a alça de ligação ao Ca^{2+} , seguido pela α -hélice 2 (resíduos 37 - 54) a qual se liga à folha β -antiparalela (resíduos 75 - 77 e 82 - 84). Finalmente está a α -hélice 3 (resíduos 90 - 108) que se liga à região alça C-terminal (resíduos 109 - 120), que é bastante flexível. A presença de 7 pontes dissulfeto é característica das PLA_2 do grupo IIA (Tabela 1) (Arni e Ward, 1996; Valentin e Lambeau, 2000).

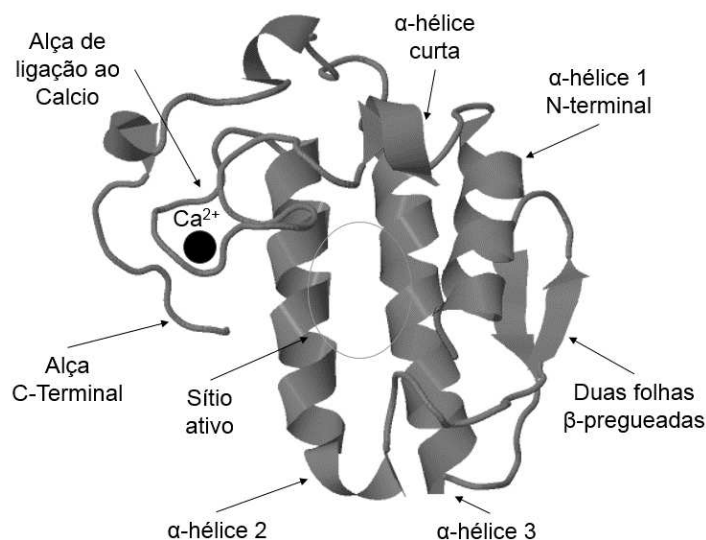


Fig. 4. Representação em fita de uma PLA_2 anticoagulante classe II do veneno de *Vipera russelli russelli*. (PDB id: 1VIP.A) (Carredano *et al.*, 1998). O íon Ca^{2+} é representado como uma esfera preta.

Três regiões demonstram alto grau de homologia na sequência de aminoácidos e contribuem para a formação dos elementos estruturais secundários e terciários: hélice N-terminal (hélice 1), região de ligação ao cálcio e canal hidrofóbico (formado pelas hélices 2, 3 e pelo sítio catalítico). Esta última região se liga às caudas dos ácidos graxos dos fosfolípidos. As regiões que mostram um menor grau de homologia correspondem aos elementos estruturais menos restritos e provavelmente são responsáveis pelos diversos efeitos farmacológicos das PLA_2 e venenos (Kini, 2003).

O maior aspecto estrutural das PLA_2 é a plataforma definida por duas α -hélices longas e antiparalelas ligadas por duas pontes dissulfeto. Estas duas hélices não mostram um carácter anfipático claro, geralmente as cadeias laterais dos aminoácidos hidrofílicos são expostos ao solvente e os resíduos hidrofóbicos apontando para o núcleo da proteína.

Exceções importantes incluem os aminoácidos que formam a rede catalítica (His48, Asp49, Asp99 e Tyr52) que estão situados nestas duas hélices (Arni e Ward, 1996).

O cálcio é cofator essencial na catálise e sua substituição por outros íons bivalentes, resulta na perda de atividade (Yu *et al.*, 1993). A Figura 5A ilustra o sítio de união ao cálcio, no qual o cátion é coordenado por átomos de oxigênio do grupo carboxilato de Asp49 e três átomos de oxigênio do carbonila dos resíduos Tyr28, Gly30 e Gly32, esta região denomina-se “alça de ligação ao cálcio” (região 25-33). Duas moléculas de água completam a esfera de coordenação do íon cálcio formando uma bipirâmide pentagonal. Uma ponte dissulfeto (Cys27-Cys44) segura a correta orientação relativa da alça de união do cálcio em relação aos aminoácidos que formam a rede catalítica (Maraganore *et al.*, 1984; Arni e Ward, 1996).

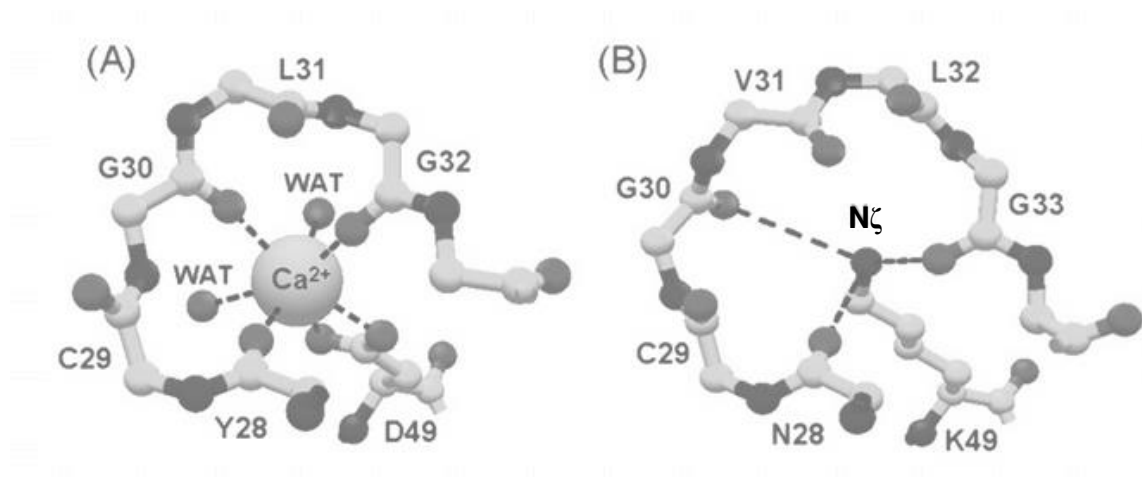


Fig. 5. Representação de bola e bastão da alça de ligação ao íon cálcio. (A) PLA₂ D49 cataliticamente ativa; o íon cálcio é mostrado com suas sete coordenações. (B) Região análoga na PLA₂ K49, cataliticamente inativa, o átomo N ζ de Lys49 ocupa a posição do íon cálcio formando três pontes com os átomos de oxigênio da cadeia principal (Ward *et al.*, 1998) (WAT=água).

As PLA₂ homólogas que ocorrem na natureza, apresentam o resíduo Asp49 (D49) trocado por Lys (K49) (Maraganore *et al.*, 1984; Francis *et al.*, 1991) ou Ser (Krizaj *et al.*, 1991) e não são cataliticamente ativos. A Figura 5B mostra uma representação bola e bastão de PLA₂ homóloga com Lys49, revelando que o seu átomo N ζ é coordenado pelo oxigênio da carbonila dos resíduos Asn28, Gly30 e Gly33, ocupando a posição do íon cálcio nas PLA₂ com Asp49 (Holland *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1998).

O sítio catalítico das PLA₂ compreende os resíduos His48, Tyr52, Tyr73, Asp99 e uma molécula de água. No mecanismo de catálise proposto (Figura 6), o átomo N ζ_2 do resíduo His48 está estabilizado por uma ligação com o oxigênio do resíduo Asp99, que por

sua vez está ligado ao oxigênio do resíduo Tyr52 e Tyr73; essa ligação está totalmente conservada. O átomo N δ_1 do resíduo His48 se comporta como uma base polarizando e retirando um próton da molécula de água, estruturalmente conservada, que participa da formação de um intermediário tetraédrico. A molécula de água promove o ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do substrato. Subsequentemente à hidrólise da ligação acil-éster na posição sn-2 do fosfoglicerídeo (substrato), o próton é doado pelo anel imidazólico para o oxigênio que forma então o grupo álcool do lisofosfolípídeo a ser liberado e três moléculas de água se deslocam para dentro do sitio ativo (Verheij *et al.*, 1980; Scott, 1997; Magro *et al.*, 2009).

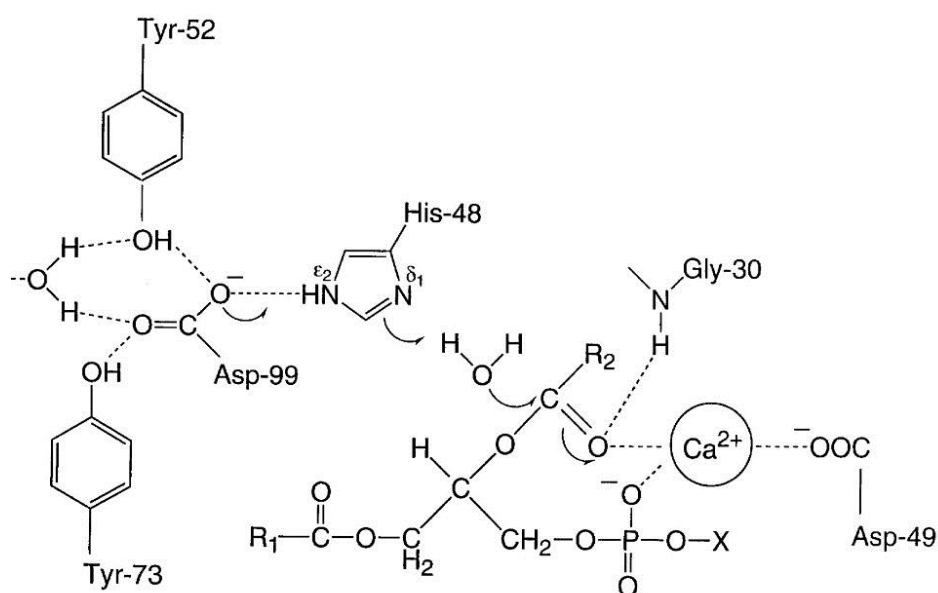


Fig. 6. Representação esquemática do mecanismo catalítico da PLA₂ (Janssen *et al.*, 1999).

O íon cálcio está ligado pelos oxigênios da Tyr28, Gly30, Gly32 e pelo oxigênio da cadeia lateral do Asp49. No mecanismo da catálise, o cálcio tem dupla função, fixar o fosfato e estabilizar a carga negativa do oxigênio do grupo carbonil da ligação éster da posição sn-2 do substrato (Yang, 1994).

Nas PLA₂ homólogas K49 a substituição do resíduo D49 por K49 afeta drasticamente a ligação do Ca²⁺ às PLA₂, justificando sua baixa ou inexistente atividade catalítica. Apesar da inatividade catalítica, as PLA₂ K49 apresentam atividade lítica sobre membranas por mecanismos independentes da liberação do ácido araquidônico (Selistre de Araújo *et al.*,

1996; Ownby *et al.*, 1999). Por outro lado, as diferenças de alguns resíduos ao longo da cadeia polipeptídica tornam a PLA₂ K49 extremamente importante pela particularidade estrutural que se vê refletida na função farmacológica de cada uma (Ponce-Soto *et al.*, 2007).

1.3.2. Ação biológica das PLA₂

As PLA₂ são as principais proteínas tóxicas do veneno e têm um papel importante na imobilização e captura da presa. Além disso, apresentam uma ampla variedade de efeitos farmacológicos (Tabela 2) (Kini, 2003). Esta diversidade farmacológica deriva do processo micro-evolutivo acelerado, através do qual ocorre substituição de aminoácidos em regiões localizadas principalmente na superfície destas moléculas (Ponce-Soto *et al.*, 2007).

Tabela 2. Efeitos farmacológicos das enzimas PLA₂ de veneno (Adaptado de Kini, 2003).

- Miotoxicidade	- Atividade hemolítica
Mionecrose local	- Atividade indução hemoglobinúria
Miotoxicidade sistêmica	- Hemorragia interna
- Neurotoxicidade	- Atividade convulsante
Neurotoxicidade pré-sináptica	- Atividade hipotensiva
Neurotoxicidade pós-sináptica	- Atividade edematogênica
- Cardiotoxicidade	- Dano tecidual ou orgânico
- Efeito anticoagulante	Fígado, rim, pulmão, testículos e pituitária
- Iniciação da agregação plaquetária	- Proliferação e migração celular
- Inibição da agregação plaquetária	- Atividade bactericida

No caso das PLA₂ D49, a maioria dos efeitos farmacológicos é produto da atividade enzimática. A modificação dos resíduos catalíticos diminui tais efeitos, porém outras atividades são mantidas, o que indica a existência de regiões diferentes ao sítio catalítico, as quais determinam suas atividades tóxicas e farmacológicas (Soares *et al.*, 2001).

As PLA₂ procedentes de veneno de serpentes possuem habilidade de unir-se a um “sítio específico”, devido à sua alta afinidade de ligar-se a proteínas específicas que atuam como receptores. Essa ligação específica de PLA₂ se dispõe pela presença de um sítio “farmacológico” em sua superfície, que é independente do sítio catalítico (Kini, 2003).

A interação de alta afinidade da PLA₂ com seu receptor (proteína alvo) deve-se provavelmente à complementaridade de carga, hidrofobicidade e forças de Van der Waals, que ocorre entre o sítio farmacológico e o sítio alvo na superfície do receptor protéico. A identificação dos sítios farmacológicos tem o potencial de desenvolver novos sistemas úteis, devido ao amplo espectro de especificidade em tecidos e órgãos, para o “direcionamento” de proteínas específicas a um alvo particular (Ponce-Soto *et al.*, 2007).

1.3.3. Miotoxinas PLA₂

As miotoxinas PLA₂ são componentes abundantes dos venenos de serpentes da família Viperidae. O modo de ação das PLA₂ miotóxicas K49 e D49 no músculo ocorrem por vias diferentes, mas no geral causam lise do sarcolema e um estado de mionecrose (Fletcher *et al.*, 1996). Essas miotoxinas PLA₂ também se caracterizam pelo seu forte caráter associativo em dímeros, que é a forma mais comum de polimerização encontrada para as PLA₂ miotóxicas, e eventualmente em tetrâmeros (Arni e Ward, 1996).

As miotoxinas PLA₂ purificadas até o presente são moléculas compactas, estáveis às variações de temperatura, pH, concentração salina alta e na presença de solventes orgânicos. Devido a estas características, não se desnaturam em condições usuais de trabalho, durante os processos de purificação e testes biológicos (Gutierrez e Lomonte, 1995). Estas características são acentuadas principalmente quando as PLA₂ se encontram associadas, por exemplo, em dímeros, o que é comum com as PLA₂ homólogas K49.

A pesar de suas diferenças na atividade enzimática, PLA₂ D49 e K49 são miotóxicas, implicando dois mecanismos de ação diferentes. Miotoxinas PLA₂ D49 dependem de sua atividade catalítica para produzir necrose nas fibras musculares (Gutiérrez e Ownby, 2003). Em contraste, as PLA₂ homólogas K49 miotóxicas, cataliticamente inativas, utilizam como principal determinante de toxicidade um sítio que abrange os resíduos 115-129 na região C-terminal, a qual inclui uma combinação variável de resíduos catiônicos e aromáticos/hidrofóbicos (Lomonte *et al.*, 2003). Os dois tipos de miotoxinas alteram a permeabilidade da membrana plasmática e iniciam uma série de eventos degenerativos cujos mecanismos moleculares envolvidos ainda estão pobremente caracterizados (Montecucco *et al.*, 2008).

Uma vez produzida a lesão da membrana plasmática por desarranjo dos componentes fosfolipídicos, ocorre um ingresso elevado de cálcio, o que gera alterações na fibra muscular, denominadas lesões delta, hipercontração dos miofilamentos, alterações mitocondriais, ruptura das membranas e formação de densidades floculentas que resultam da aglomeração de proteínas da membrana interna da mitocôndria (Gutiérrez e Ownby, 2003). A somatória de todas essas alterações resultam em morte celular. As diferentes miotoxinas PLA₂ induzem um padrão similar de alterações morfológicas, independentemente de se possuem atividade enzimática (Gutiérrez e Ownby, 2003). A Figura 7 mostra um resumo da hipótese para o mecanismo de ação celular das miotoxinas PLA₂.

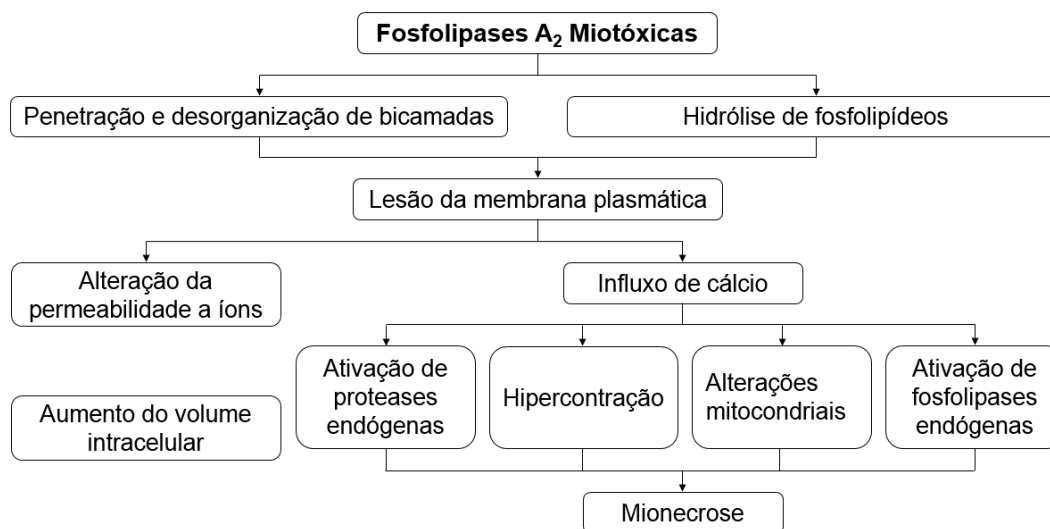


Fig. 7. Hipótese do mecanismo de ação das fosfolipases A₂ miotóxicas do veneno de *Bothrops* sp. (adaptado de Gutierrez e Lomonte, 2003).

1.4. *Bothrops andianus*

1.4.1. Descrição

A serpente tem um tamanho médio adulto entre 60 e 70 cm (até 125 cm). A cor dorsal do corpo é verde-oliva e café, sendo mais escura anteriormente. Tem entre 18 e 25 marcas escuras triangulares (como fones de ouvido) no dorso. Este padrão dorsal é contínuo no corpo. A cauda tem entre 5 e 12 manchas bordejadas em negro. A cor fica mais escura em exemplares velhos até ser marrom escuro uniforme. A ponta da cauda em organismos recém-nascidos é preta ou amarela. O ventre é de cor creme ou amarelo mosqueado com manchas

escuras de cor cinza, marrom ou preto. O dorso da cabeça é mais escura do que o corpo e alguns exemplares têm manchas irregulares de cor marrom ou preto na área parietal. Os lados da cabeça acima do focinho são de cor verde-oliva ou verde amarelado e por debaixo deste são mais claros e algumas vezes com tons marrons. Aprecia-se uma linha bem definida de cor chocolate que vem por trás do olho e vai para baixo diagonalmente para o canto da boca, a qual é delimitada ventralmente por uma fina linha clara. O lado ventral da cabeça é de cor creme ou amarelo manchado com pontos pretos. A íris é amarelada ou amarela verdoso e a língua é de cor roxa escura, marrom ou preta (Campbell e Lamar, 1989) (Figura 8). Encontra-se distribuída no centro dos Andes do Peru, nos departamentos de Cuzco, Puno e na Bolívia, nos departamentos de La Paz, Cochabamba e Santa Cruz. (Campbell e Lamar, 2004).



Fig. 8. Serpente *Bothrops andianus* (Campbell e Lamar, 1989).

Frente ao exposto, este trabalhou purificou fosfolipases A₂ a partir do veneno de *Bothrops andianus*, para avaliar suas atividades farmacológicas e contribuir ao entendimento do mecanismo fisiopatológico dos envenenamentos por serpentes botrópicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto foi purificar fosfolipases A₂ a partir do veneno total de *Bothrops andianus*, caracterizá-las físico-quimicamente e avaliar suas atividades farmacológicas.

2.2. Objetivos específicos

- Purificar as frações PLA₂ a partir do veneno total de *Bothrops andianus* em duas etapas, através de cromatografia de exclusão molecular e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC-RP).
- Caracterizar físico-quimicamente as frações PLA₂ através de:
 - Determinação da massa molecular por eletroforese SDS-PAGE e espectrometria de massa em tandem por electrospray (ESI).
 - Caracterização da estrutura primária.
 - Estudo dos fatores que afetam a velocidade de reação da fração PLA₂.
- Avaliar as atividades farmacológicas das frações PLA₂ através de:
 - Miotoxicidade local e sistêmica *in vivo* em camundongos segundo os níveis de CK plasmático.
 - Atividade inflamatória *in vivo* em camundongos medindo o aumento do volume da pata inoculada com as PLA₂ em comparação com um controle.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Veneno e reagentes

O veneno total de *Bothrops andianus* foi cedido pela professora Corina Vera Gonzáles, do Instituto de Biomedicina y Biotecnologia de Arequipa-Peru. Todos os solventes, produtos químicos e reagentes utilizados são de grau HPLC, grau sequência ou de alto grau de pureza, obtidos da Sigma, Aldrich Chemicals (Aldrich Chemical Co, Inc. - Wisconsin, U.S.A.) e da Merk (Merck - Darmstadt, Germany).

3.2. Animais

Para avaliar as atividades farmacológicas, foram utilizados camundongos machos Swiss (18 - 20 g), obtidos do Biotério Central da Unicamp, mantidos a 25°C com alimentos e água *ad libitum*. Todos os ensaios biológicos foram feitos com autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP protocolo nº 3123-1, ver Anexo 1).

3.3. Purificação de miotoxinas PLA₂ a partir do veneno total de *B. andianus*

3.3.1. Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75

Na primeira etapa de purificação, 50 mg do veneno total foram homogeneizada em 1,0 mL de tampão (NH₄)HCO₃ 50 mM, pH 8,0 e centrifugada a 4,527 x G durante 3 min. O sobrenadante límpido obtido foi aplicado numa coluna de exclusão molecular Sephadex G-75 (Kontex Flex Colum 78 x 2 cm) previamente equilibrada com tampão (NH₄)HCO₃ 50 mM. A amostra foi coletada a um fluxo constante de 0,2 mL/min com um coletor de frações automático (RedeFrac, Pharmacia Biotech). O perfil proteico foi monitorado na absorbância de 280 nm, utilizando-se um espectrofotômetro 700 Plus (Femto, Brasil). O pico de interesse foi liofilizado e armazenado a -20°C (Ponce-Soto *et al.*, 2007).

3.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC-RP)

Na segunda etapa de purificação se utilizou um sistema HPLC-RP com controlador (Waters Automated Gradient Controller) e detector (Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector), equipado com duas bombas (Waters 515 HPLC Pump), um injetor de amostras

com um “loop” de 200 μ L e uma coluna C18 Supelco Discovery®BIO Wide Pore (25 cm x 4,6 mm x 10 μ m), equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1 %, (v/v) (tampão A) pH 3,5. Posteriormente, a fração III obtida da cromatografia por exclusão molecular foi dissolvida (5 mg) em 120 μ L de TFA 0,1 % mais 80 μ L de $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ (50 mM). A solução obtida foi centrifugada a 4,527 x G durante 3 min para clarificação e o sobrenadante foi aplicado na coluna. As proteínas foram eluídas usando-se uma gradiente linear contínuo (0 - 100 %) do tampão B (acetonitrila 66 %). O fluxo foi mantido constante a 1 mL/min e monitorado a 280 nm. As frações obtidas foram liofilizadas e armazenadas a -20°C.

3.3.3. Atividade específica, recuperação e grau de pureza

Utilizou-se uma tabela de purificação com três parâmetros que permitiram avaliar a eficiência do processo de purificação de uma proteína. O primeiro parâmetro foi a atividade específica (U/mg) que é a razão entre a atividade enzimática (UE/mL), e a quantidade de proteína (mg/mL) presente em cada etapa de purificação. Esse índice aumentou ao longo da purificação. O segundo parâmetro foi a recuperação que indica quanto (em %) da proteína de interesse ativa presente no material de partida foi recuperado ao final da purificação. O terceiro parâmetro foi o grau de pureza que indica quantas vezes, em relação ao material de partida, a proteína de interesse foi “concentrada”. Calculou-se como a razão entre as atividades específicas inicial (material de partida) e final (proteína pura). As frações obtidas foram submetidas a uma repurificação em HPLC-RP como descrito no ponto 3.3.2., para a confirmação da pureza da proteína.

3.4. Determinação da massa molecular

3.4.1. Eletroforese em SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por Laemmli (1970). O gel de poliacrilamida foi feito de modo descontínuo apresentando um gel de concentração de 5 % e um gel de corrida de 12,5 %. O gel foi preparado utilizando-se uma solução de acrilamida/bisacrilamida estoque. O gel de concentração a 5 % foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e o gel de

corrida foi feito utilizando-se o tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. Em ambos os géis foram acrescentados 0,1 % (v/v) de SDS 20 %.

A eletroforese foi realizada em uma cuba de preparação de gel (Hoefer® Mighty Small Dual Gel Caster). As amostras e os marcadores de massa molecular foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl 0,075 M, pH 6,8; 10 % de glicerol; 4 % de SDS; 0,001 % de azul de bromofenol). A corrida eletroforética foi realizada a 30 mA. Os géis foram corados com solução de Coomassie Blue 0,05 % “overnight” a 37°C, o excesso de corante foi removido em ácido acético 7 %.

3.4.2. Espectrometria de Massa por Electrospray (ESI)

Uma alíquota de cada proteína (4,5 µL) foi injetada em uma coluna C18 HPLC-RP (nanoAcquity HPLC, Waters) acoplada com um sistema de espectrometria de massas em tandem nano-electrospray em um espectrômetro de massa Q-ToF Ultima API (MicroMass/Waters) (ESI-QTOF-MS/MS) a um fluxo de 600 nL/min. A gradiente foi de 0 - 50 % de acetonitrila em ácido fórmico 0,1 % durante 45 min. O instrumento foi operado em modo MS contínuo e a aquisição de dados foi de 100 - 3000 m/z a velocidade de 1 s e um delay de 0,1 s. Os espectros foram acumulados cerca de 300 scans e os múltiplos dados carregados produzidos pelo espectrômetro de massa na escala m/z foram convertidos para escala de massa (massa molecular) usando o software Maxium Entropy fornecido com o pacote Masslynx 4.1. Os parâmetros de processamento foram: faixa de massa de saída 6000 - 20000 Da com resolução de 0,1 Da/canal; a proporção de intensidade mínima entre picos sucessivos é 20 % (esquerdo e direito). O espectro deconvolucionado foi então suavizado (canais 2x3, Savitzky Golay smooth) e os valores de massa foram obtidos usando o 80 % do topo do pico e a largura mínima do pico a meia altura de quatro canais.

3.5. Caracterização da estrutura primária

3.5.1. Redução e alquilação

As proteínas (PLA₂) purificadas com HPLC-RP e liofilizadas, foram re-suspendidas em (NH₄)HCO₃ 100 mM, e uréia 8 M (1:1), seguido de DTT 10 mM final e se incubou a 56°C por 25 min para redução das pontes dissulfeto. A Iodoacetamida 14 mM final foi

utilizada para alquilar o grupo tiol livre a partir dos resíduos de cisteína reduzidos. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 30 min protegida da luz. A amostra foi diluída em $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 50 mM (1:5) para reduzir a concentração da uréia.

3.5.2. Hidrólise enzimática

As proteínas purificadas foram hidrolisadas com tripsina pancreática bovina de grau sequência em $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 0,4 % pH 8,5 e 37°C durante 16 h, em uma proporção enzima: substrato de 1:50 (v/v). A reação foi interrompida com TFA na concentração final de 0,4 %. Finalmente as amostras foram armazenadas a -20°C.

3.5.3 Processamento dos produtos tripticos

Os estudos para a caracterização estrutural da PLA_2 foram realizados no LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron), através do LNBio (Laboratório Nacional de Biociências) junto ao Portal de Serviços do Laboratório de Espectrometria de Massas. O estudo de homologia sequencial dos diferentes peptídeos obtidos por clivagem enzimática foram analisados por espectrômetros acoplados ao sistema de cromatografia de alto desempenho e foi utilizado com fonte de ionização tipo nanoelectrospray (ESI). Para o estudo do alinhamento dos fragmentos peptídicos foi utilizado o banco de dados NCBI-BLAST.

3.6. Atividade PLA_2

A determinação da atividade PLA_2 foi realizada segundo o método descrito por Cho e Kézdy (1991), Holzer e Mackessy (1996) e adaptado para microplaca (Ponce-Soto *et al.*, 2007).

Colocou-se 200 μL de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl_2 10 mM e NaCl 100 mM pH 8,0), 20 μL do substrato cromogênico ácido 4-nitro-(3-octanoiloxi) benzóico (NOAB) e 20 μL de amostra (PLA_2), ou 20 μL de água no caso do controle, obtendo-se um volume final de 260 μL por cada pocinho de microplaca. Após a adição de 20 μL das PLA_2 em teste, a mistura foi incubada a 37°C por 40 min, as absorbâncias foram lidas em intervalos de 10 min. A atividade enzimática, expressa como a velocidade inicial da reação (V_0) foi calculada baseada no aumento da absorbância após 20 min. O ensaio foi realizado em triplicata, monitorando a formação do produto ácido 4-nitro-(3 hidroxí) benzóico (cromóforo), lendo-

se a absorvância a 425 nm (VERSA Max microplate reader Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Uma unidade enzimática (UE) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 nmol/min.

3.7. Estudo dos fatores que afetam a velocidade de reação da PLA₂

3.7.1. Efeito da concentração do substrato na atividade PLA₂

Este ensaio foi feito variando-se a concentração do substrato cromogênico NOAB. As concentrações utilizadas foram: 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20; 40 mM. A metodologia utilizada foi conforme ao item 3.6.

3.7.2. Efeito do pH na atividade PLA₂

Os ensaios do efeito do pH sobre a atividade PLA₂ foram realizados em meios de reação preparados com diferentes valores de pH (4 - 11). Para cada pH foi feito um controle e a determinação da atividade PLA₂ foi feita conforme ao item 3.6. Os tampões utilizados nos experimentos foram: tampão Citrato de sódio pH 4, 5 e 6, tampão Tris-HCl pH 7 e 8, tampão Glicina pH 9, 10 e 11 respectivamente.

3.7.3. Efeito da temperatura na atividade PLA₂

Para determinar o efeito da temperatura, estudou-se a atividade PLA₂ em meios de reação a 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C. A atividade enzimática foi determinada conforme ao item 3.6.

3.7.4. Efeito de íons divalentes na atividade PLA₂

A atividade PLA₂ foi estudada na presença de íons divalentes: Mg²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺ e Zn²⁺. Para a preparação dos tampões, foram usados sais dos respectivos metais e a determinação da atividade PLA₂ foi feita conforme ao item 3.6.

3.8. Avaliação das atividades farmacológicas de PLA₂

3.8.1. Atividade miotóxica através do nível de CK plasmático em camundongos

a. Atividade miotóxica local *in vivo*

Para a avaliação da atividade miotóxica local a partir da exposição às PLA₂ e ao veneno total, 4 grupos de 4 camundongos (18 a 20 g) receberam injeções intramusculares (músculo gastrocnêmio) de doses de 1000 µg/Kg de peso das PLA₂ e do veneno total dissolvidas em tampão PBS (50 µL), sendo que o grupo controle recebe apenas PBS.

Após a aplicação das toxinas, em intervalos de tempo (0, 1, 3, 6, 9, 12 e 24 h), amostras de sangue foram coletadas da cauda em capilares heparinizados e o plasma foi removido para a determinação dos níveis plasmáticos de creatina-quinase (CK) (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Esta atividade enzimática foi medida através do ensaio cinético utilizando o kit CK-NAC Bioliquid, assim, 200 µL do substrato foi reconstituído e mantido a temperatura ambiente, logo acrescentou-se 10 µL de plasma obtido por centrifugação do sangrado da cauda do camundongo. A mistura foi incubada a 37°C por 3 min, registrando as leituras após 1, 2 e 3 min. A diferença média de absorbância por minuto ($\Delta A/\text{min}$) foi determinada, diminuindo-se cada leitura da anterior e tirando-se a média dos valores. A média foi multiplicada pelo fator 3376 (Kit de CK Bioliquid) para obter a atividade da CK total em U/L. O ensaio é baseado na velocidade de aumento na concentração de NADH medida a 340 nm que é proporcional à atividade de CK da amostra.

b. Atividade miotóxica sistêmica *in vivo*

Para a avaliação da atividade miotóxica sistêmica induzida a partir da exposição às PLA₂ e ao veneno total, 4 grupos de 4 camundongos (18 a 20 g) receberam injeções intravenosas (via veia caudal), de doses de 1000 µg/Kg de peso, dissolvidas em tampão PBS (50 µL) das PLA₂ e do veneno total, respectivamente. Sendo que o grupo controle recebe apenas PBS.

Após a aplicação das toxinas, em intervalos de tempo (0, 1, 3, 6, 9, 12 e 24 h), amostras de sangue foram coletadas da cauda em capilares heparinizados e o plasma foi

removido para a determinação dos níveis plasmáticos de creatina-quinase (CK). A metodologia utilizada para determinar a atividade CK foi a mesma descrita no item anterior.

3.8.2. Atividade inflamatória em camundongos (edema de pata)

Na atividade edematogênica, 4 Grupos de 4 camundongos (18 a 20 g) receberam injeções subcutâneas na pata direita do veneno total e das toxinas PLA₂. Veneno total (1000 µg/Kg de peso) e as PLA₂ (1000 µg/Kg de peso) foram dissolvidos em 50 µL de tampão PBS e inoculados no coxim plantar da pata direita do camundongo; a pata esquerda recebeu 50 µL de PBS como branco. E o grupo controle apenas recebeu 50 µL de tampão PBS em ambas patas.

O volume de pata foi avaliado com um Paquímetro), imediatamente antes da injeção (basal) e após intervalos de tempo (0,5, 1, 3, 6, 12 e 24 h). A atividade edematogênica foi expressa como porcentagem do aumento de volume da pata direita em comparação à pata esquerda (controle). A fórmula para calcular a porcentagem de edema foi $=\{[(ED - EI) \times 100] \div EI\}$, onde ED é o edema na pata direita (volume) e EI (controle da pata esquerda) medido a cada intervalo de tempo.

3.9. Análise Estatística

Os resultados são reportados como a média $\pm$ erro padrão. A significância foi obtida através do teste t-student quando vários grupos experimentais são comparados entre eles e com o grupo controle. O limite de confiança é de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Purificação das PLA₂ BanTX-I e BanTX-II a partir do veneno total de *B. andianus*

4.1.1. Cromatografia de Exclusão Molecular em coluna de Sephadex G-75

O perfil cromatográfico do veneno total de *B. andianus* obtido por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 mostrou quatro picos, denominados I, II, III e IV. A fração III que representa aproximadamente 13 % do veneno total seco (Figura 9), mostrou a maior atividade PLA₂ (ver item 4.1.2.). Posteriormente essa fração foi liofilizada e submetida a HPLC-RP.

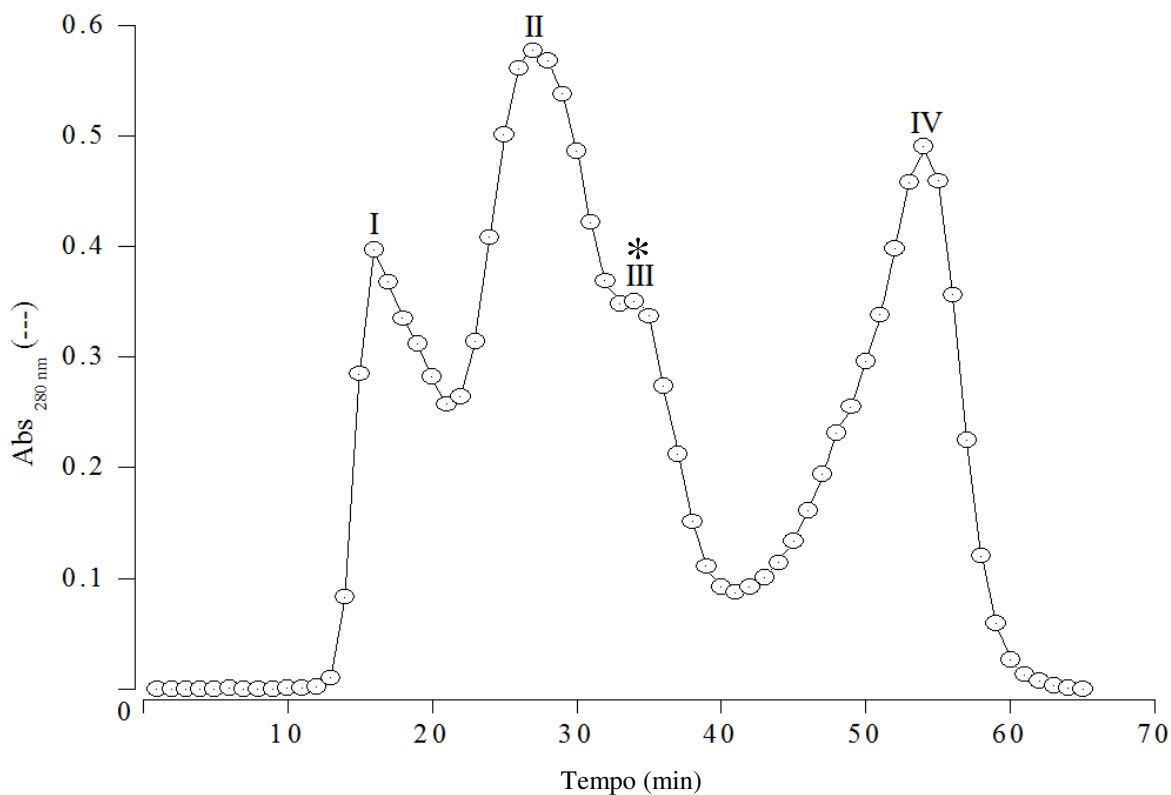


Fig. 9. Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75 do veneno total de *B. andianus*. (*) Pico III apresenta a maior atividade PLA₂. O perfil cromatográfico foi monitorado a 280 nm.

4.1.2. Atividade PLA₂ das frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular

Na Figura 10 se mostra a atividade PLA₂ medida no veneno total e nas frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75. A atividade enzimática expressa como a velocidade inicial da reação (V_o) mostrou que o veneno total de *B. andianus* tem $1,54 \pm 0,03$ nmoles/min/mg, no caso da fração II foi de $1,71 \pm 0,09$ nmoles/min/mg e a fração III mostrou $4,09 \pm 0,06$ nmoles/min/mg. O perfil da atividade PLA₂ frente ao substrato cromogênico NOAB indica que a fração III contém a maior atividade PLA₂, sugerindo a presença de miotoxinas PLA₂.

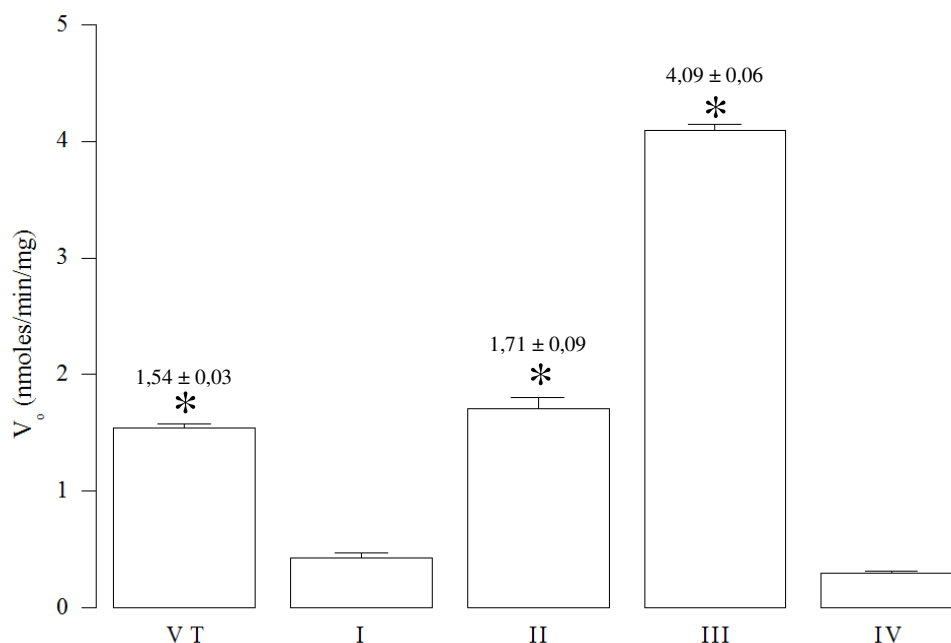


Fig. 10. Atividade PLA₂ do veneno total (VT) e das frações (I-IV) obtidas por cromatografia de exclusão molecular. Monitorado na absorbância de 425 nm. (*) Frações que apresentaram atividade PLA₂. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão ($p < 0.05$).

4.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC-RP)

A fração III foi submetida a uma segunda etapa cromatográfica em HPLC-RP, obtendo-se 5 picos, denominados III-1, III-2, III-3, III-4 e III-5 (Figura 11). Com cada pico se fez o monitoramento da atividade miotóxica. Os picos III-3 e III-4 induziram miotoxicidade local com doses de 500, 1000 e 2500 $\mu\text{g/Kg}$ de peso, dissolvidos em 50 μL de PBS, no músculo gastrocnêmio de camundongo (dados não mostrados). E foram denominados BanTX-I e BanTX-II, respectivamente.

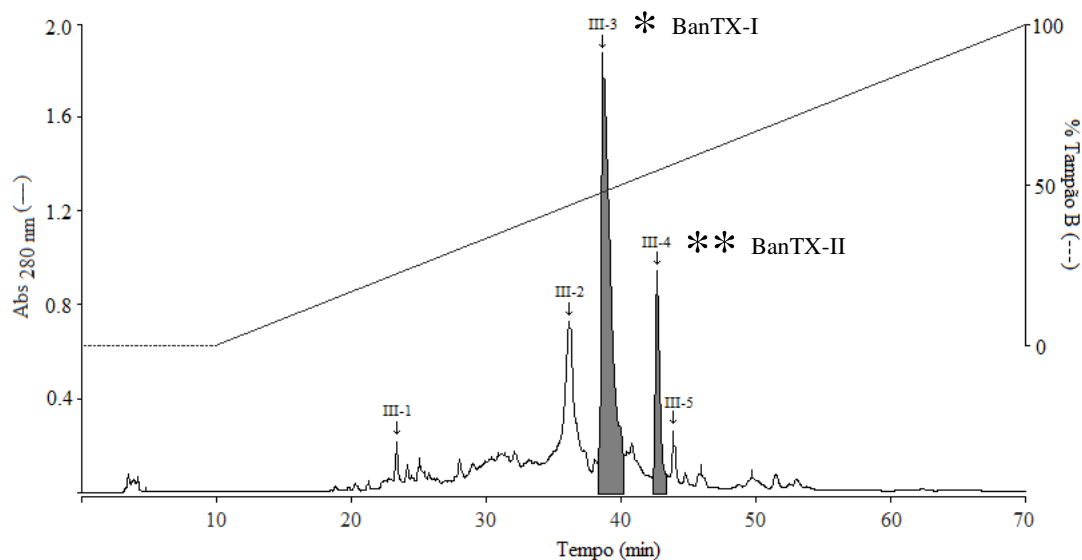


Fig. 11. Perfil cromatográfico por HPLC-RP da fração III obtida por cromatografia de exclusão molecular. A eluição das amostras foi realizada usando-se uma gradiente linear contínua (0 - 100 %) de concentração do tampão B. O fluxo foi mantido constante a 1 mL/min e monitorado a 280 nm. Frações BanTX-I (*) e BanTX-II (**) estão indicadas pelas áreas sombreadas.

4.1.4. Atividade PLA₂ das frações obtidas por HPLC-RP

A BanTX-I mostrou baixa atividade PLA₂ ($0,85 \pm 0,09$ nmoles/min/mg), enquanto que a BanTX-II evidenciou alta atividade PLA₂ ($18,24 \pm 0,84$ nmoles/min/mg) (Figura 12). Estes picos, foram selecionados para sua caracterização físico-química e farmacológica.

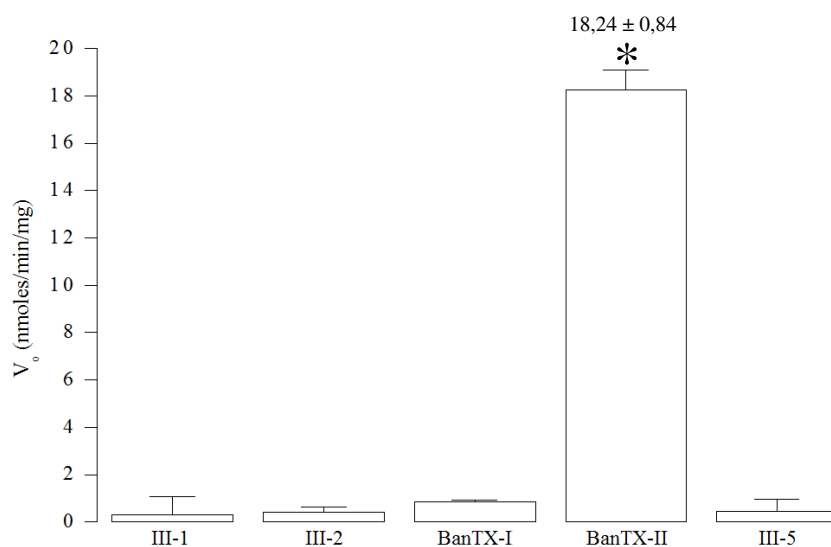


Fig. 12. Atividade PLA₂ das frações obtidas por HPLC-RP. Monitorado na absorbância de 425 nm. (*) Fração que apresenta atividade PLA₂ ($p < 0.05$).

4.1.5. Atividade específica, recuperação e grau de pureza

A Tabela 3 exibe um resumo das etapas do processo de purificação, assim como a atividade específica, a porcentagem de recuperação e purificação em cada etapa. A BanTX-II apresenta atividade específica de 396521 U/mg, recuperando-se um 59,22 % e sendo purificada 3478 vezes em relação ao veneno total.

Tabela 3. Atividade específica e recuperação de BanTX-II obtida por HPLC-RP.

Etapa de Purificação	Vol. (mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade (UE/mL)	Atividade Total (UT)	Atividade Específica (U/mg)	Recup. (%)	Purif. (vezes)
Veneno total (VT)	20	0,6753	77	1540	114,02	100	1
Sephadex G-75 (Fração III)	1	0,0755	204,5	204,5	2708,61	13,28	24
HPLC-RP (BanTX-II)	1	0,0023	912	912	396521,74	59,22	3478

Com a finalidade de verificar o grau de pureza, as frações BanTX-I e BanTX-II, foram repurificadas em um sistema de HPLC-RP utilizando-se as mesmas condições de purificação descritas anteriormente. A BanTX-I foi eluída aos $39,2 \pm 1,1$ min, em concentração de $49,2 \pm 0,4$ % de tampão B (Figura 13A). Por outro lado a BanTX-II foi eluída aos $42,5 \pm 0,7$ min e em concentração do tampão B de $53,6 \pm 0,3$ % (Figura 13B). O perfil cromatográfico mostra a presença de apenas um único pico protéico, para ambas frações, evidenciando alto grau de pureza.

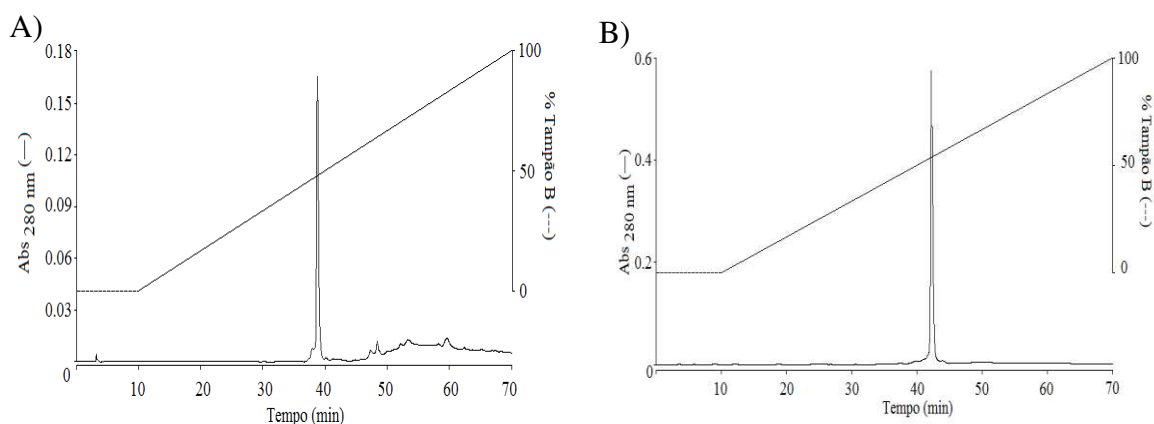


Fig. 13. Re-cromatografia das frações BanTX-I (A) e BanTX-II (B) em HPLC-RP. A eluição foi realizada usando-se uma gradiente linear contínua (0 - 100 %) de concentração do tampão B. O fluxo foi mantido constante a 1 mL/min e monitorado a 280 nm.

4.2. Determinação da massa molecular de BanTX-I e BanTX-II

4.2.1. Eletroforese em SDS-PAGE

A Figura 14 evidencia as massas moleculares determinadas por SDS PAGE. A BanTX-I em condições não reduzidas (linha 2) apresenta uma massa molecular ~28 kDa e em condições reduzidas uma massa ~14 kDa (linha 4). No caso da BanTX-II, mostra-se a presença de uma única banda eletroforética com massa molecular ~14 kDa em relação aos marcadores de massa molecular (linha 1), tanto em condições não reduzidas quanto reduzidas (linhas 3 e 5). A presença de uma única banda eletroforética indica o alto grau de homogeneidade das frações proteicas.

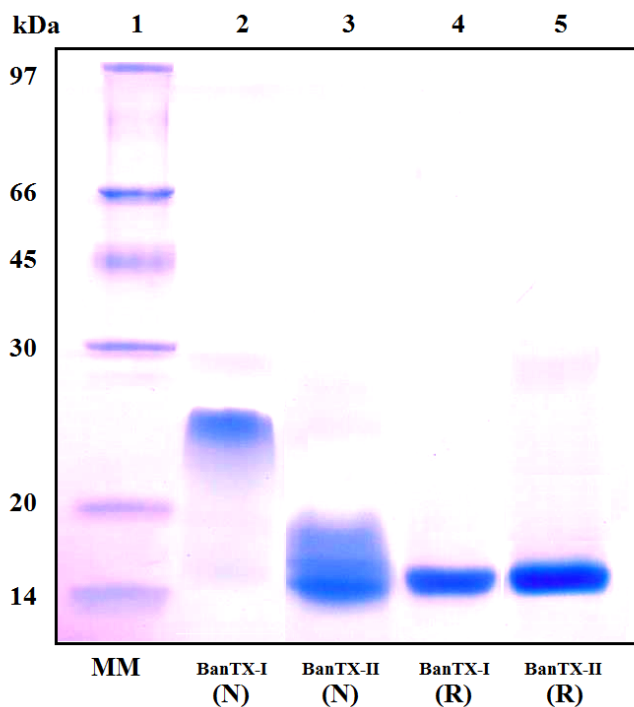


Fig. 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) SDS-PAGE, corado com comassie blue. Pista 1: marcador de massa molecular (MM); Linha 2: BanTX-I não reduzida (N); Linha 4: BanTX-I reduzida (R) com DTT; Linha 3: BanTX-II não reduzida (N); Linha 5: BanTX-II reduzida (R) com DTT.

4.2.2. Espectrometria de Massa por Electrospray (ESI)

A espectrometria de massa por electrospray (ESI) permite constatar a pureza das frações BanTX-I e BanTX-II, obtidas a partir da fração III por HPLC-RP, procedente do veneno total de

B. andianus. As frações BanTX-I e BanTX-II apresentam massas moleculares de 13712 Da (Figura 15A) e 13693 Da (Figura 15B), respectivamente.

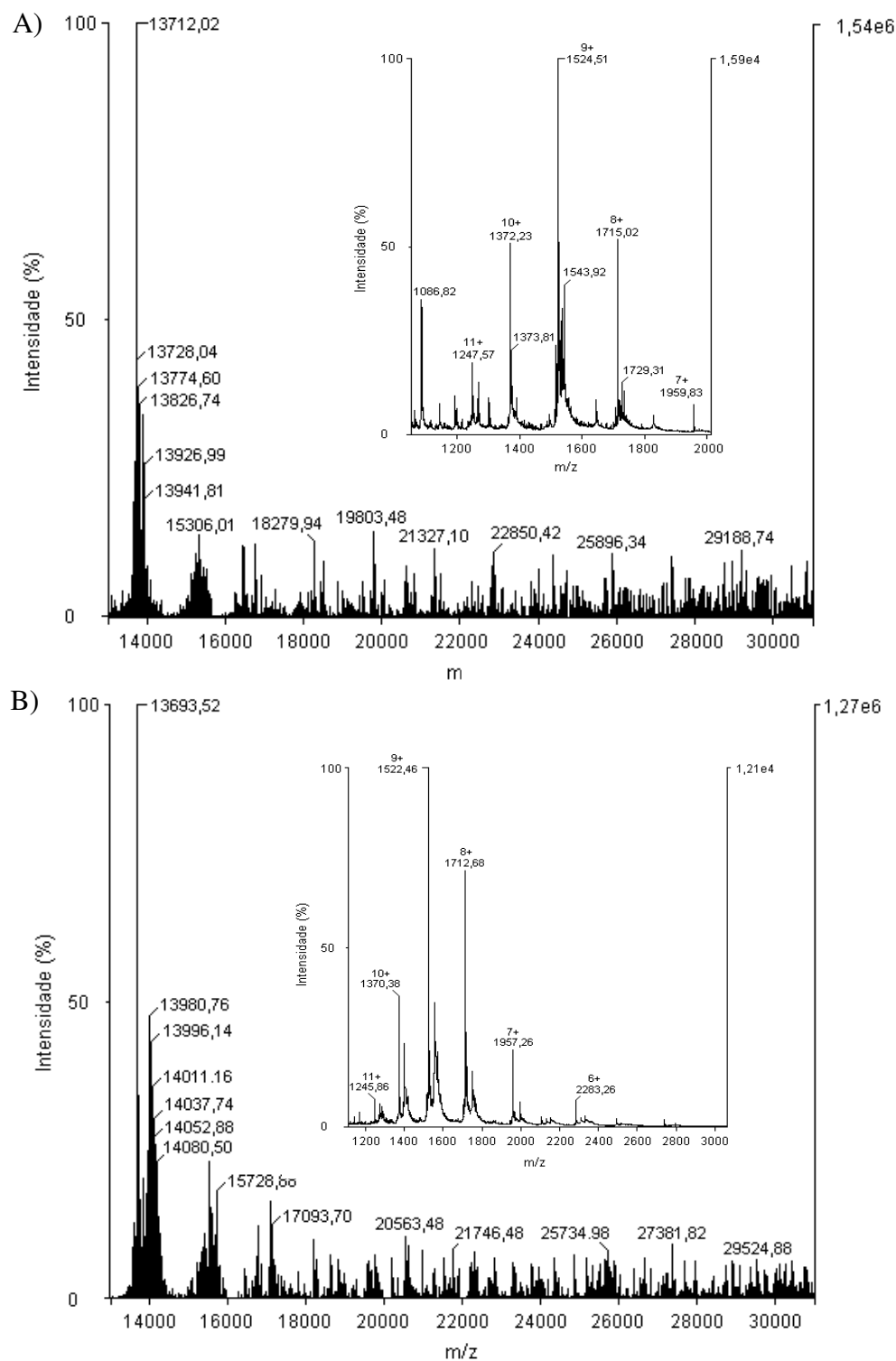


Fig. 15. Deconvolução do espectro e espectros de massa crus (insertos) da BanTX-I (A) e BanTX-II (B) através de espectrometria de massas por Electrospray (ESI).

4.3. Caracterização da estrutura primária da PLA₂ homóloga K49 e PLA₂

4.3.1. PLA₂ homóloga K49 (BanTX-I)

A BanTX-I foi digerida com tripsina bovina e os peptídeos trípticos resultantes foram separados em HPLC-RP. Foram obtidos 16 picos (dados não mostrados), estes picos foram coletados manualmente e liofilizados. O sequenciamento de cada peptídeo foi feito por espectrometria de massas em tandem ESI-Q-TOF/MS/MS. Os dados obtidos foram processados usando o software Mascot MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com). A Tabela 4 mostra as massas e a sequência deduzida de cada uma a partir dos peptídeos obtidos por clivagem tríptica.

Tabela 4. Massas e sequências de aminoácidos ESI-Q-TOF/MS/MS dos peptídeos trípticos da BanTX-I. Os peptídeos foram separados por HPLC-RP. Os resíduos de Lisina (K) e Arginina (R) mostrados em negrito foram deduzidos da clivagem pela tripsina.

Número Resíduo	Massa (Da) Observada	Massa (Da) Esperada	Massa (Da) Calculada	Sequência de Aminoácido
6 - 17	1329,6409	1328,6770	1328,7122	MI/LL/IQ/KETGK/QNPA K
18 - 31	767,2840	1532,5533	1532,6500	SYGAYGCNCGVL/IG R
32 - 40	494,2458	986,4771	986,4781	GQ/KPK/QDATD R
36 - 46	712,7723	1423,5301	1423,5973	DATDRCCYVH K
41 - 46	433,6687	865,3229	865,3575	CCYVH K
47 - 51	379,6612	757,3079	757,3251	CCYK/Q K
51 - 58	459,7242	917,4338	917,464	KL/ITGCDP K
52 - 59	459,7275	917,4404	917,4641	L/ITGCDPK/Q K
60 - 67	552,7197	1103,4248	1103,5036	DRYSYSW K
62 - 69	538,7118	1075,4090	1075,4974	YSYSWK/QD K
68 - 88	861,3489	2581,0250	2581,0917	DK/QTI/LVCGENNPCL/IQ/KEL/ICECD K
70 - 95	1041,4467	3121,3183	3121,4123	TI/LVCGENNPCL/IQ/KEL/ICECDK/QAVAI/LCL/ IR
89 - 103	861,4178	1720,8211	1720,8930	AVAI/LCL/IRENL/IGTYN K
96 - 104	533,7349	1065,4553	1065,5454	ENL/IGTYNK/Q K
105 - 114	706,3359	1410,6572	1410,7230	YRYHL/IK/QPF C K
107 - 115	610,8028	1219,5911	1219,6536	YHL/IK/QPF C K/Q K

C = cisteína alquilada.

Não foram discriminados os resíduos de Leucina (L) e Isoleucina (I) em nenhuma das sequências reportadas pois não são distinguíveis no espectro CID (Dissociação Induzida por Colisão) de baixa energia. Devido à calibração externa aplicada a todos os espectros não foi possível resolver a diferença de 0,036 Da entre resíduos de Glutamina (Q) e Lisina (K), exceto para as Lisinas que foram deduzidas em base à clivagem da tripsina (Tripsina cliva no extremo carboxi-terminal de Lisina ou Arginina). Cada peptídeo sequenciado foi

submetido à base de dados NCBI usando o programa BLAST-p protein search com uma procura restrita a proteínas básicas com atividade fosfolipase A₂ procedente do veneno de serpente.

O espectro de massa contendo a série de íons *b* e *y* do quinto peptídeo eluído do HPLC-RP que corresponde aos resíduos 41 - 46 é mostrado na Figura 16.

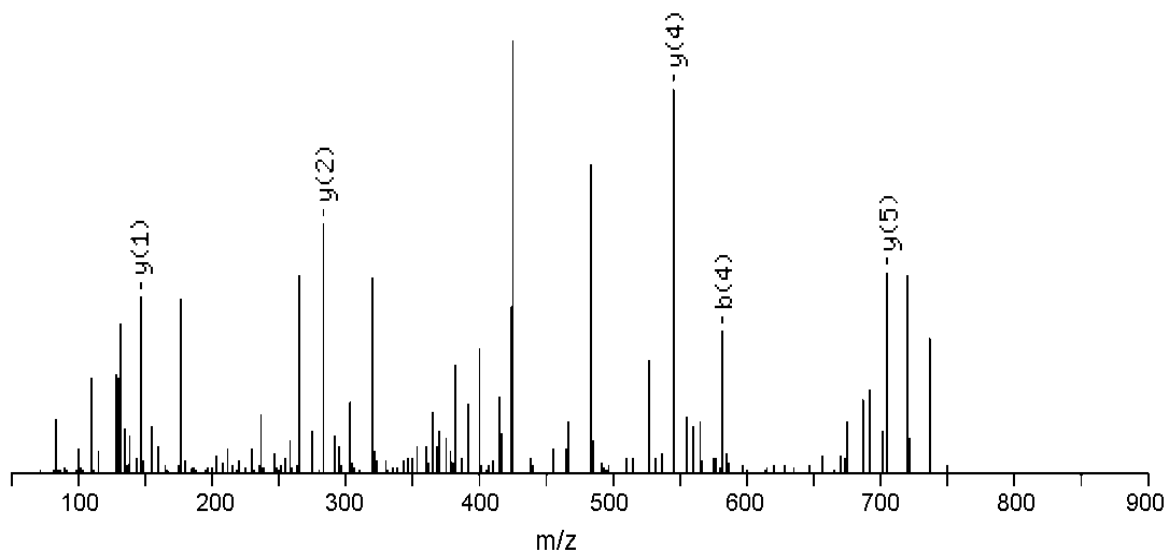


Fig. 16. Espectro ESI-QTOF-MS/MS mostrando as series de íons *b* e *y* do quinto peptídeo (resíduos 41 - 46) da BanTX-I.

A Tabela 5 mostra os valores (relação *m/z*) que permitem determinar a sequência de aminoácidos do quinto peptídeo eluído do HPLC-RP. O peptídeo tem a sequência C C Y V H K, considerado o peptídeo crítico, sugerindo que esta proteína pertence à PLA₂ homologa

Tabela 5. Valores da série *b* e *y* do quinto peptídeo (resíduos 41 - 46) da BanTX-I.

Nº	b	Seq.	y	Nº
1	161,0379	C	-	6
2	321,0686	C	706,3341	5
3	484,1319	Y	546,3035	4
4	583,2003	V	383,2401	3
5	720,2592	H	284,1717	2
6	-	K	147,1128	1

A Figura 17 evidencia homologia sequencial entre 83 e 97 % nas PLA₂ homólogas K49 provenientes de veneno de serpentes da família Viperidae. Mostra-se as regiões concenso

associadas a funções farmacológicas abordadas no presente estudo, como a região C-terminal responsável da atividade miotóxica. As regiões variáveis podem estar associadas a outros efeitos farmacológicos não considerados no presente estudo. O algoritmo utilizado no alinhamento gera as aberturas ou “gaps” as quais podem produzir algumas alterações na posição de determinados resíduos aminoácídicos.

Fig. 17. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da BanTX-I com outras PLA₂ homólogas K49. BhTX-I de *Bothrops jararacussu* (Cintra *et al.*, 1993); Cr-5 de *Calloselasma rhodostoma* (Bonfim *et al.*, 2006); BaTX de *Bothrops alternatus* (Ponce-Soto *et al.*, 2007); BbTX-II de *Bothrops brazili* (Huancahuire-Vega *et al.*, 2009) e Bp-12 de *Bothrops pauloensis* (Randazzo-Moura *et al.*, 2008).

A BanTX-II foi digerida com tripsina bovina e os peptídeos trípticos resultantes foram separados em HPLC-RP. Foram obtidos 11 picos (dados não mostrados), cada pico foi coletado manualmente e liofilizado. O sequenciamento de cada peptídeo foi feito por espectrometria de massas em tandem ESI-Q-TOF/MS/MS. Os dados obtidos foram processados usando o software Mascot MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com). A Tabela 6 mostra as massas e a sequência deduzida de cada um dos peptídeos obtidos a partir da clivagem tríptica.

Tabela 6. Massas e sequências de aminoácidos ESI-Q-TOF/MS/MS dos peptídeos trípticos da BanTX-II. Os peptídeos foram separados por HPLC-RP. Os resíduos de Lisina (K) e Arginina (R) mostrados em negrito foram deduzidos da clivagem pela tripsina.

Número Resíduo	Massa (Da) Observada	Massa (Da) Esperada	Massa (Da) Calculada	Sequência de Aminoácido
1 - 15	897,4470	1792,8794	1792,9182	DL/IWQ/KFGQ/KMI/LL/IK/QETG K
16 - 37	867,3603	2599,0590	2599,1301	L/IPFPYYTTYGCYCGWGGQ/KGQ/KP K
38 - 53	1032,3509	2062,6872	2062,7754	DATDRCCFVHDCCY GK
43 - 53	753,2378	1504,4610	1504,5356	CCFVHDCCY GK
54 - 60	430,7253	859,4361	859,4586	L/ITNCK/QP K
61 - 68	524,2348	1046,4550	1046,4781	TDRYSYS R
69 - 83	831,8327	1661,6508	1661,7389	ENGVI/LI/LCGEGTPCE K
84 - 90	476,6880	951,3614	951,3790	Q/KI/LCECD K
91 - 101	653,153	1305,6161	1305,6612	AAAVCFRENL/I R
98 - 104	462,2418	922,4691	922,4872	ENL/IRTY K
106 - 116	708,3277	1414,6408	1414,6737	RYMAYPDVL/IC K

C = cisteína alquilada.

Na Figura 18 é mostrado o espectro de massa contendo a série de íons *b* e *y* do quarto peptídeo (resíduos 43 - 53) eluído por HPLC-RP.

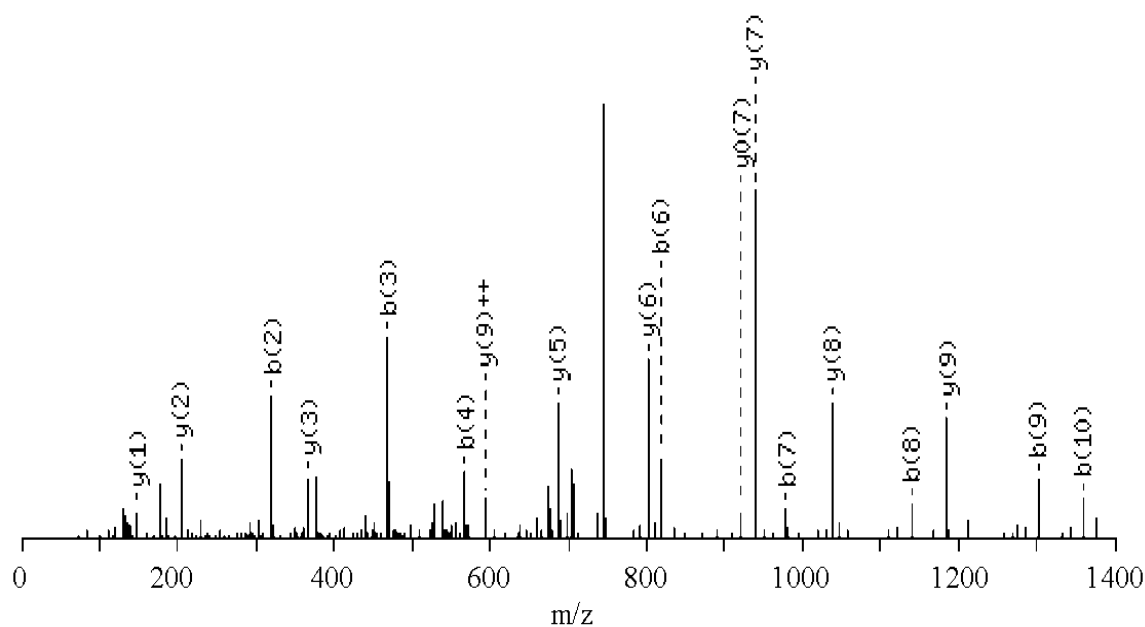


Fig. 18. Espectro ESI-QTOF-MS/MS mostrando as series de íons *b* e *y* do quarto peptídeo (resíduos 43 - 53) da BanTX-II.

A Tabela 7 mostra os valores (relação m/z) que permitem determinar a sequência de aminoácidos do quarto peptídeo eluído do HPLC-RP. O peptídeo tem a sequência C C F V H D C C Y G K, mostrando um resíduo de Asp (D) na posição 49 da estrutura primária da proteína, este resultado indica que a BanTX-II pertence à família das PLA₂ D49, cataliticamente ativas.

Tabela 7. Valores da série *b* e *y* do quarto peptídeo (resíduos 43 - 53) da BanTX-II.

Nº	b	Seq.	y	y ⁺⁺	y ⁰	Nº
1	161,0379	C	-	-	-	11
2	321,0686	C	1345,5122	673,2598	1327,5017	10
3	468,1370	F	1185,4816	593,2444	1167,4710	9
4	567,2054	V	1038,4132	519,7102	1020,4026	8
5	704,2643	H	939,3447	470,1760	921,3342	7
6	819,2913	D	802,2858	401,6466	784,2753	6
7	979,3219	C	687,2589	344,1331	-	5
8	1139,3526	C	527,2282	264,1178	-	4
9	1302,4159	Y	367,1976	184,1024	-	3
10	1359,4373	G	204,1443	102,5708	-	2
11	-	K	147,1128	74,0600	-	1

O segundo peptídeo (Tabela 6) mostra a sequência L/I P F P Y Y T T Y **G C Y C G W G G** Q/K G Q/K P K, evidenciando os aminoácidos nas posições (G25), (Y)27, (G)29, (G)31, (G)32 os quais fazem parte da alça de ligação ao cálcio, domínio altamente conservado nas PLA₂ D49 e cuja presença é necessária para a atividade catalítica.

A Figura 19 mostra o alinhamento da PLA₂ BanTX-II com outras toxinas PLA₂ D49 representativas de veneno de serpentes da família Viperidae. O grau de identidade de sequência está ao redor de 60 - 70 %. Os resíduos de cisteína se encontram em posições idênticas com as outras PLA₂. Também se mostra regiões consenso que correspondem a sequências conservadas de domínios comuns ao grupo das PLA₂ D49 (região N-terminal, sítio catalítico, alça de ligação ao Ca²⁺ e o domínio C-terminal). As regiões variáveis podem estar associadas a outros efeitos farmacológicos não considerados no presente estudo. O algoritmo utilizado no alinhamento gera as aberturas ou “gaps” as quais podem produzir algumas alterações na posição de determinados resíduos aminoácídicos.

4.4. Fatores que afetam a velocidade de reação da PLA₂ BanTX-II

O efeito da concentração do substrato (NOAB) na atividade PLA₂ de BanTX-II apresenta uma cinética sigmoidal, principalmente em baixas concentrações do substrato, indicativo de um comportamento tipo alostérico (Figura 20A). O valor de pH ótimo foi 8 e a temperatura ótima está na faixa de 35 - 40°C (Figura 20B e C, respectivamente), entretanto, aos 45 e 50°C ainda mantém atividade enzimática. A enzima mostra completa dependência de íon Ca²⁺ para exibir sua atividade enzimática ótima, devido a que em ausência de Ca²⁺ apresenta baixa atividade. A adição de íons Mg²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺ e Zn²⁺ (10 mM) na ausência ou presença de baixas concentrações de cálcio (1 mM), diminui significativamente a atividade PLA₂ da BanTX-II (Figura 20D).

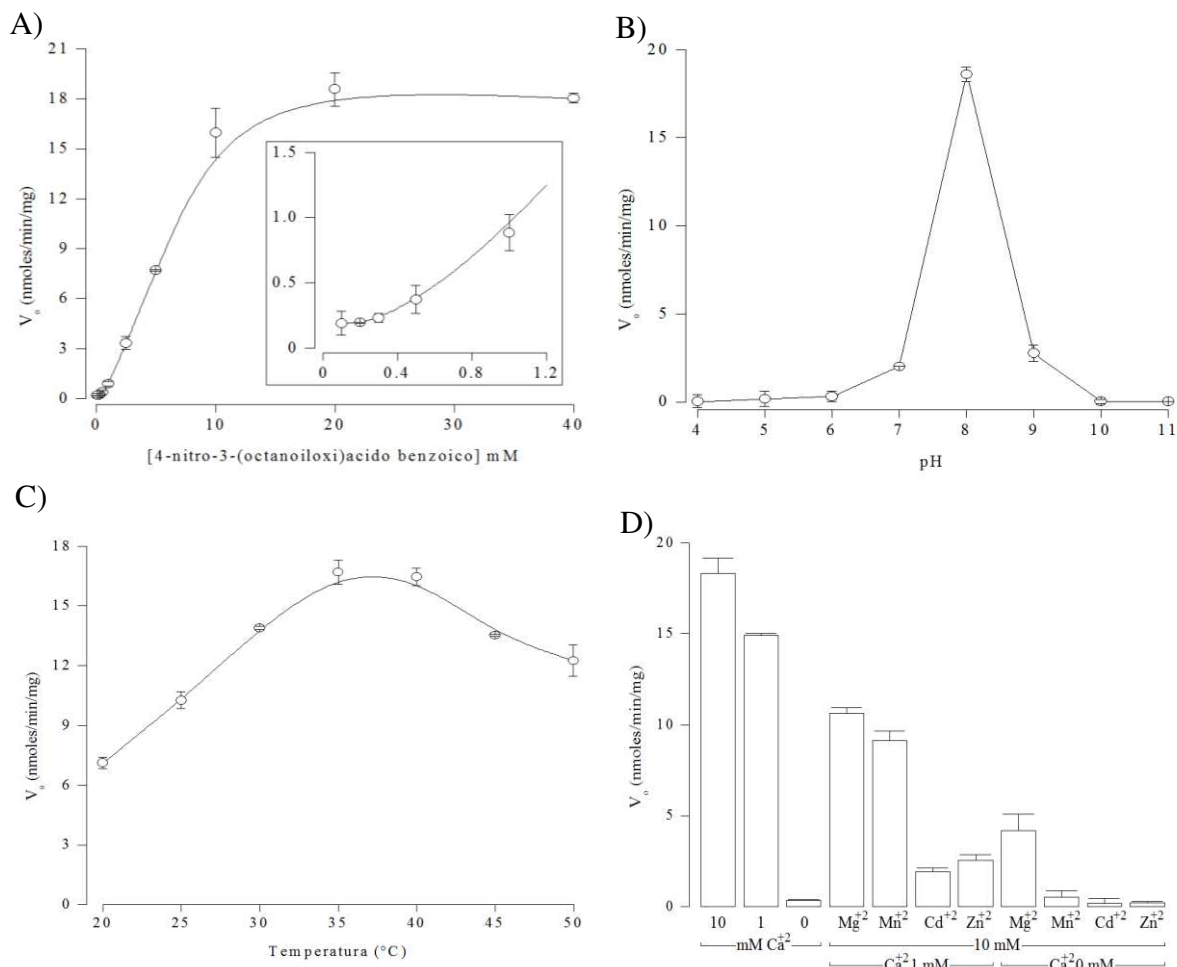


Fig. 20. Estudos cinéticos da atividade PLA₂ de BanTX-II. (A) Efeito da concentração do substrato. Inseto: detalhes em baixas concentrações, (B) Efeito do pH, (C) Efeito da temperatura, (D) Efeito dos íons divalentes ($p < 0.05$).

4.5. Avaliação das atividades farmacológicas

4.5.1. Atividade miotóxica através do nível de CK plasmático em camundongos

a. Atividade miotóxica local *in vivo*

Os estudos realizados para avaliar o efeito miotóxico local do veneno total e das PLA₂ BanTX-I e BanTX-II, aplicando 1000 µg/Kg de peso dissolvidos em 50 µL de PBS, mostram que os níveis de CK plasmáticos aumentam drasticamente nas primeiras 1 a 3 h do tratamento, atingindo até 698,37 ± 35,64; 898,22 ± 30,53 e 1012,45 ± 69,36 U/L de CK para o veneno total e as toxinas BanTX-I e BanTX-II, respectivamente. Posteriormente os níveis de CK plasmático voltaram a níveis normais, após 24 h (Figura 21).

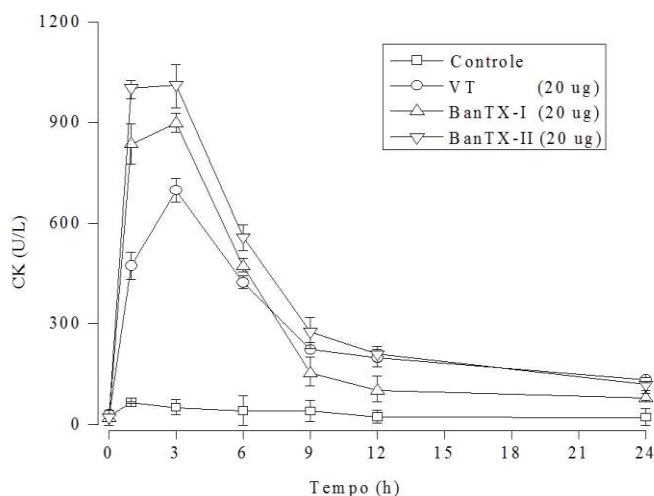


Fig. 21. Atividade miotóxica local do veneno total e das toxinas BanTX-I e BanTX-II de *B. andianus* inoculados em camundongo. Mostra-se os valores de creatina quinase (CK) plasmático, incrementados ao longo do tempo, após a administração intramuscular do veneno e das toxinas BanTX-I e BanTX-II (20 µg/indivíduo) (n=4).

b. Atividade miotóxica sistêmica *in vivo*

Os resultados mostram que o veneno total e as PLA₂ BanTX-I e BanTX-II de *B. andianus* inoculados por via intravenosa não induziram efeito miotóxico sistêmico, já que os níveis de CK plasmático ao longo do tempo não tiveram aumento significativo em relação ao controle, que recebeu PBS (Figura 22), o máximo valor atingido foi 158 U/L de CK 3 h

após a inoculação da toxina BanTX-II. Por outro lado, na miototoxicidade local, a mesma toxina induziu elevação dos níveis de CK acima de 1000 U/L.

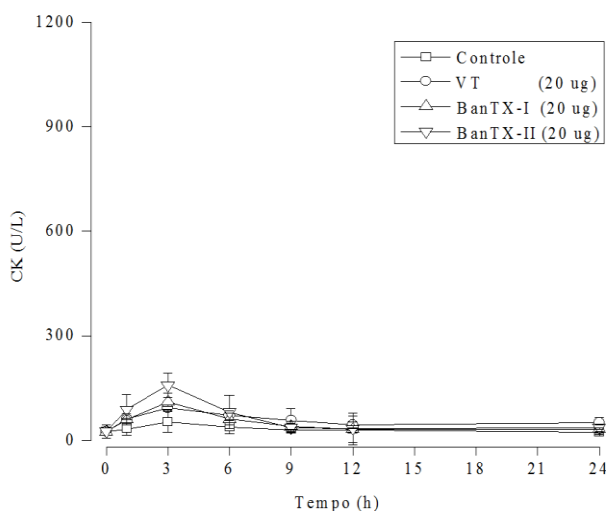


Fig. 22. Atividade miotóxica sistêmica do veneno e das toxinas BanTX-I e BanTX-II (20 µg/indivíduo) de *B. andianus* inoculados em camundongo. Mostram-se os valores de CK plasmático ao longo do tempo, após administração intravenosa (n=4).

4.5.2. Atividade inflamatória em camundongos (edema de pata)

Os resultados mostram que tanto a BanTX-I quanto a BanTX-II apresentam efeito inflamatório, através do edema de pata de camundongo. A Figura 22 mostra que o veneno total, a BanTX-I e BanTX-II induziram edema moderado de 41, 49 e 57 %, respectivamente, após 1 h de aplicação, evidenciando o aumento na permeabilidade vascular no lugar da aplicação. Posteriormente, o edema diminuiu após 24 h no caso das toxinas BanTX-I e II.

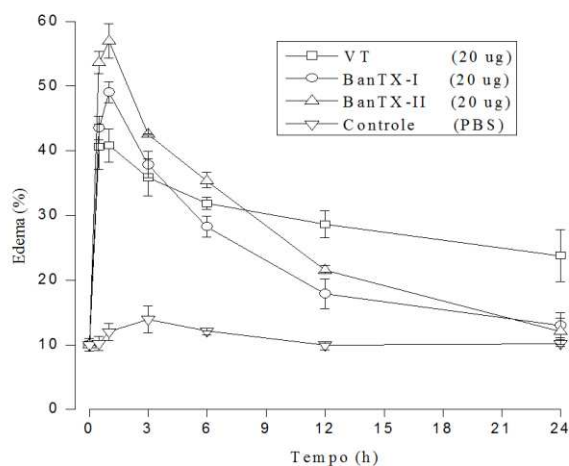


Fig. 23. Atividade inflamatória em camundongos (edema de pata) do veneno total e das PLA₂ BanTX-I e BanTX-II de *B. andianus*.

5. DISCUSSÃO

A purificação de frações a partir dos venenos de serpentes e a caracterização destas através de parâmetros cinéticos e atividades biológicas constitui o suporte da Toxinologia, com a finalidade de analisar e entender a patofisiologia do envenenamento e o melhoramento das modalidades terapêuticas no entorno clínico (Angulo e Lomonte, 2009).

Pouco é conhecido sobre o veneno de *B. andianus* e seus componentes. Alguns estudos foram realizados, assim temos, a serino-protease com atividade *trombina-like* denominada “TLBan” capaz de degradar fibrinogênio e produzir agregação plaquetária (Valeriano-Zapana *et al.*, 2012). Testes pré-clínicos indicaram que o Antiveneno Antibotrópico Peruano (PABA) mostra eficácia em neutralizar esse veneno (Schneider *et al.*, 2012). Entretanto, estudos sobre as atividades tóxicas de PLA₂ D49 ou PLA₂ homólogas K49 ainda é escassa. No presente trabalho descrevemos a purificação e caracterização físico-química/farmacológica das PLA₂s homólogas K49 e D49 obtidas a partir do veneno de *B. andianus*, denominadas BanTX-I e BanTX-II, respectivamente. Com o objetivo de entender a relação entre a estrutura dessas proteínas e sua função biológica.

As PLA₂ de venenos de serpentes têm sido exaustivamente purificadas usando combinação de métodos cromatográficos como exclusão molecular, troca iônica, HPLC-RP e afinidade usando inibidores naturais, anticorpos e heparina (Ownby *et al.*, 1999; Ponce-Soto *et al.*, 2007; Pereañez *et al.*, 2009). Em nosso trabalho a estratégia de purificação constou de duas etapas, utilizando a cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 e um sistema de HPLC-RP. A cromatografia de exclusão molecular separou o veneno total em 4 frações (I - IV). A atividade PLA₂ foi encontrada no veneno total e nos picos II e III, sendo que este último mostrou a maior atividade e portanto foi selecionado para a seguinte etapa de purificação. A cromatografia por HPLC-RP separou a fração III em 5 frações (III-1 a III-5). Destas, a fração III-3 mostrou baixa atividade PLA₂ e a fração III-4 mostrou atividade PLA₂, mas ambas frações possuíam atividade miotóxica local em camundongos, portanto passaram a ser denominadas como BanTX-I e BanTX-II respectivamente. Como resultado do método utilizado, várias toxinas PLA₂ (BaTX, Cdcum6, VLPLA₂) foram eficientemente purificadas (Ponce-Soto *et al.*, 2007; Pereañez *et al.*, 2009; Vija *et al.*, 2009).

A PLA₂ BanTX-II, mostrou alta atividade específica (396521 U/mg), ao redor de 3500 vezes mais do que o veneno total. A recuperação neste processo é de 59 %, valores maiores do que o obtido por Fuly *et al.*, (2000) (atividade específica 1428 U/mg e recuperação 1,42 %) que purificaram a PLA₂ LM-PLA₂-II em duas etapas (filtração gel e HPLC-RP), a partir do veneno de *Lachesis muta*. Ademais, confirmou-se o grau de pureza das proteínas, as duas PLA₂ (BanTX-I e II) foram repurificadas em HPLC-RP nas mesmas condições. O perfil cromatográfico mostrou a presença de um único pico de eluição para cada fração, confirmando alto grau de homogeneidade molecular das proteínas.

Várias PLA₂ purificadas a partir de venenos botrópicos são oligômeros constituídos por duas ou mais subunidades (Magro *et al.*, 2009). Em alguns casos, a formação de complexos é importante para a potência farmacológica e toxicidade das PLA₂. No caso das PLA₂ em estudo, o perfil eletroforético mostra que a BanTX-I, em ausência de DTT (agente redutor), apresenta uma banda protéica com Mr de ~28 kDa, e usando DTT mostra uma banda protéica com Mr de ~14 kDa. Por outro lado, a BanTX-II, na ausência e presença de DTT, apresentam uma única banda protéica com massa relativa (Mr) de ~14 kDa. Esta condição de formar agregados dímeros é uma característica típica das PLA₂ (Ponce-Soto *et al.*, 2007), proporcionando um efeito conhecido como cooperatividade, também característico de enzimas alostéricas, o que reforçaria a possibilidade desta enzima ter um comportamento com tendência alostérica.

Os valores de massa molecular das PLA₂ BanTX-I e BanTX-II obtido a partir da espectrometria por Electrospray (ESI) foi de 13712 Da e 13693 Da, respectivamente. Valores similares a outras PLA₂ miotóxicas isoladas de veneno de serpente como *Bothrops alternatus*, *Bothrops marajoensis*, entre outras (Ponce-Soto *et al.*, 2007, 2010; Perumal *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2010).

No caso da PLA₂ homóloga K49 BanTX-I, o peptídeo trípico que compreende os resíduos 41 a 46 mostra a sequência de aminoácidos (C)41 (C)42 (Y)43 (V)44 (H)45 (K)46 determinado através de espectrometria de massa em tandem ESI-QTOF-MS/MS. De acordo com os estudos realizados por Ownby *et al.*, (1999), Chioato e Ward (2003), Ponce-Soto *et al.*, (2007), Randazzo-Moura *et al.*, (2008), Huancahuire-Vega *et al.*, (2009), esta sequência mostra consenso dentro desta família de proteínas com estrutura de PLA₂.

O análise da estrutura primária da PLA₂ BanTX-I mostra a presença do aminoácido Lys (K) na posição 49. A comparação da sequência da PLA₂ K49 BanTX-I revela um alto nível de conservação dentro da família de proteínas PLA₂ K49. Os resultados mostram que a estrutura primária da PLA₂ K49 BanTX-I possui um alto grau de identidade da sequência de aminoácidos (83,6 - 97,3 %) com outras PLA₂ K49. O alinhamento da sequência da PLA₂ homóloga K49 BanTX-I com outras sequências completas de PLA₂ homólogas K49 mostra a presença de algumas mutações importantes. Assim, a PLA₂ K49 BanTX-I mostra as seguintes substituições: Q→K(35), D→N(58), Q→K(84), G→D/N(102) e F→L(114). O fato de que estas substituições não modificam os efeitos farmacológicos aqui estudados (atividade miotóxica e inflamatória) revela que estas poderiam ser relacionadas com outras atividades não analisadas neste trabalho.

As PLA₂ homólogas K49 apresentam o aminoácido glutamina na posição 11 (Q11) (Cintra *et al.*, 1993; Bonfim *et al.*, 2006; Ponce-Soto *et al.*, 2007; Randazzo-Moura *et al.*, 2008; Huancahuire-Vega *et al.*, 2009). Este evento sugere fortemente que a BanTX-I é uma PLA₂ K49, diferente das PLA₂ D49 que possuem lisina na posição 11 (K11) (Ponce-Soto *et al.*, 2006; Huancahuire-Vega *et al.*, 2009; Calgarotto *et al.*, 2008; Ponce-Soto *et al.*, 2010). As miotoxinas PLA₂ homólogas K49, enzimaticamente inativas, apresentam um resíduo de asparagina na posição 28 (N28) no lugar de tirosina (Y28), leucina na posição 32 (L32) no lugar de glicina (G32), e obviamente lisina na posição 49 (K49) no lugar de aspartato das PLA₂ D49, sendo esta última a substituição decisiva para a perda de atividade catalítica. Outras PLA₂ homólogas K49, apresentam também diferenças na expressão (Ponce-Soto, *et al.*, 2007; Randazzo-Moura *et al.*, 2010) e as atividades farmacológicas se mantêm constantes. Este fato sugere que as diferentes atividades biológicas dependem da estrutura tridimensional ou da geometria espacial da molécula para interagir como receptores de alta afinidade.

No caso da PLA₂ D49 BanTX-II, o peptídeo trípico que compreende os resíduos 43 a 53 mostra a sequência de aminoácidos (C)43 (C)44 (F)45 (V)46 (H)47 (D)48 (C)49 (C)50 (Y)51 (G)52 (K)53 determinado através de espectrometria de massa em tandem ESI-QTOF-MS/MS. Desde os estudos realizados por Arni e Ward (1996), até o presente, vêm se mostrando um alto grau de homologia na região correspondente à alça de ligação ao Ca²⁺.

Estes estudos corroboram mais uma vez que esta proteína faça parte da família das PLA₂ procedentes de veneno de serpentes.

Estudos de homologia sequencial mostrou mostrado que existem determinadas posições conservadas nas PLA₂. Na posição 1 - 2 predomina a sequência de aminoácidos (S L), na posição 4 (Q), na posição 7 - 10 (Q M I L), na posição 12 - 13 (E T), na posição 21 (Y), na posição 25 - 26 e 28 - 29 (G C e C G). Nas PLA₂ existem vários resíduos conservados que também possuem um papel crucial na expressão da atividade PLA₂. Assim temos, que as sequências de aminoácidos Y C G W (27, 28, 29 e 30) são essenciais para a formação da alça de ligação do cálcio (Arni e Ward, 1996; Kini, 1997; Kini, 2003; Ponce-Soto *et al.*, 2006, 2010, 2013). De acordo com o estudo de homologia sequencial realizado com a BanTX-II, existem algumas diferenças detectáveis, por exemplo, a substituição de (Q) por (R) na posição 33, (A) por (G) na posição 41. Apesar destas mudanças na alça de ligação ao Ca²⁺ e no sítio catalítico, respectivamente, não houve diminuição da atividade catalítica nem farmacológica. Tais mudanças provavelmente podem estar relacionadas com alguns outros efeitos biológicos (atividade hemorrágica, neurotoxicidade, coagulação e agregação plaquetária) que não foram tratados no presente trabalho.

As enzimas PLA₂ de veneno de serpente geralmente mostram o comportamento cinético de Michaelis-Menten, frente a substratos em estado micelar (Breithaupt, 1976). Entretanto, a BanTX-II é uma enzima monomérica, mas o comportamento não é hiperbólico como esperado, ao contrário apresenta uma curva sigmoide principalmente em baixas concentrações. Estes resultados concordam com o descrito por Pereañez *et al.* (2009), para a PLA₂ Cdcum6 de *Crotalus durissus cumanensis* e por Calgarotto *et al.* (2008), para a BmTX-I de *B. moojeni*.

As PLA₂ descritas na literatura são altamente estáveis e resistentes ao calor, ácidos e uréia, mas a atividade catalítica é perdida em valores de pH altos. Quando são usados substratos micelares, a atividade catalítica máxima ocorre a pH 7 - 8 e 35 - 45°C de temperatura (Breithaupt, 1976; Holzer e Mackessy, 1996; Calgarotto *et al.*, 2008; Huancahuire-Vega *et al.*, 2009; Ponce-Soto *et al.*, 2006, 2010). Tem sido demonstrado que a PLA₂ da serpente *Naja naja naja* é muito estável a temperaturas elevadas, tais como 100°C (Kini, 1997). A atividade PLA₂ da BanTX-II foi verificada em diferentes valores de pH, encontrando-se atividade enzimática ótima em pH 8. A temperatura ótima para a BanTX-II

está na faixa de 35 - 40°C, no entanto, entre 45 e 50°C a atividade ainda mantém-se elevada, indicativo da alta estabilidade da molécula ao calor.

A atividade enzimática da PLA₂ D49 BanTX-II é dependente de Ca²⁺. Em baixas concentrações de Ca²⁺ a enzima apresenta atividade total, o que está de acordo com os resultados obtidos por Shiomi *et al.* (1998) e Ponce-Soto *et al.* (2002). No entanto, a adição de outros íons divalentes (Mg²⁺, Mn²⁺) na presença e ausência de Ca²⁺ reduzem a atividade PLA₂. Os íons divalentes como Cd²⁺ e Zn²⁺ reduzem marcadamente a atividade enzimática de PLA₂ BanTX-II, indicando que estes cátions não podem substituir o Ca²⁺. Beghini *et al.*, (2000) observaram o mesmo para PLA₂ do veneno de *Crotalus durissus cascavella*. Isto pode ser explicado pela coordenação geométrica adotada pelo intermediário tetraédrico devido à presença do íon cálcio, o qual determina o comportamento eletrofílico do sítio catalítico, assim como estabiliza a alça de ligação ao cálcio e parece otimizar a conformação da proteína no local de interação com o substrato (Scott *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 1993). O requerimento estrito de cálcio é característica comum das PLA₂ de várias fontes biológicas (cobras, abelha, lagartixa, pâncreas humano, rim de rato, entre outros) (Dennis, 1994; Arni e Ward, 1996).

Sabe-se também que a ligação do Ca²⁺ às PLA₂ induz mudanças sutis na configuração do sítio ativo necessárias para exercer a atividade catalítica (Chang *et al.*, 1996). Scott *et al.*, (1990) descreveram no sítio catalítico a presença do aminoácido D49 que imobiliza o íon Ca²⁺, o qual interage com o fosfato e o oxigênio do grupo carbonil da ligação éster na posição sn-2 do fosfolipídio. Essa interação faz com que o oxigênio que tem dupla ligação com o carbono sn-2, fique temporalmente mais negativo (altera a distribuição de cargas elétricas do éster), fragilizando a dupla ligação que comporta-se como uma ligação simples induzindo que o carbono da ligação sn-2 fique mais positivo. Essa ligação fica exposta à reação catalítica que consiste no ataque nucleofílico do oxigênio (que tem carga residual negativa) pertencente a uma molécula de água (imobilizada pelo anel imidazólico da His48 presente no sítio catalítico). Portanto, o íon Ca²⁺ direciona o posicionamento do substrato no sítio ativo da enzima sugerindo que esse arranjo do sítio catalítico apresenta uma conformação exclusiva para o Ca²⁺, o que explicaria a diminuição da atividade enzimática da BanTX-II.

Os íons Mg²⁺ e Sr²⁺ induzem configurações não apropriadas na enzima e acabam diminuindo a atividade PLA₂ da β-bungarotoxina (Chu *et al.*, 2005). A inibição da PLA₂ da serpente chinesa *Naja naja naja* pelos cátions Ba²⁺ e Cd²⁺ mostram características cinéticas

de inibidores competitivos convencionais que deslocariam o Ca^{2+} do sítio ativo (Mezna *et al.*, 1994). O íon Zn^{2+} é conhecido como um forte inibidor de enzimas PLA_2 , mas a sua atividade inibitória baseia-se no modelo em que a enzima é ativada por dois íons Ca^{2+} , um é essencial e pode ser deslocado por Ba^{2+} , e o outro modula a atividade e pode ser deslocado por Zn^{2+} (Mezna *et al.*, 1994).

Para entender como o veneno exerce sua toxicidade são necessários dados quantitativos sobre a ação de toxinas individuais e suas atividades farmacológicas (Kini, 2003; Calvete *et al.*, 2009). Com essa finalidade foram avaliadas as atividades tóxicas (miotoxicidade e inflamatória) induzidas pelo veneno total e as PLA_2 BanTX-I e BanTX-II de *B. andrianus*.

O veneno de serpentes da família Viperidae (*Bothrops*, *Lachesis*, *Porthidium*, *Bothriopsis*) age principalmente no músculo produzindo mionecrose local pronunciada (Lomonte *et al.*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2008). Esta mionecrose é causada principalmente pelas PLA_2 . Além da mionecrose, as PLA_2 são consideradas as principais mediadoras da desgranulação de mastócitos, edema e inflamação (Texeira *et al.*, 2003) e miotoxicidade em mioblastos e miotubos (Angulo e Lomonte, 2005).

A miotoxicidade é definida como habilidade da toxina para induzir necrose na musculatura esquelética *in vivo*, a partir de injeção intramuscular ou, *ex vivo*, através da incubação com músculos esqueléticos diferenciados (Gutierrez e Ownby, 2003; Lomonte *et al.*, 2003) e é evidenciada pela capacidade de aumentar os níveis plasmáticos de CK após a injeção intramuscular ou intravenosa. As PLA_2 miotóxicas estão entre os principais fatores responsáveis pela necrose das fibras musculares esqueléticas observada em casos de envenenamento por serpentes e acredita-se que este evento ocorra devido à ligação destas miotoxinas à membrana plasmática das fibras musculares esqueléticas, levando à alteração na sua permeabilidade (Rufini *et al.*, 1996).

O veneno total e as PLA_2 BanTX-I e BanTX-II aumentaram drasticamente os níveis de CK plasmáticos após serem inoculadas no músculo gastrocnêmio de camundongos, este aumento de CK sugere dano muscular nas fibras musculares injetadas com a toxina, deixando notório seu efeito miotóxico local. Contrariamente, quando administradas por via intravenosa, os níveis de CK plasmático tiveram valores semelhantes ao controle, evidenciando a falta de miotoxicidade sistêmica.

Este tipo de miotoxicidade local é característica do veneno das serpentes Viperidae, cujas PLA₂ afetam predominantemente os músculos localizados na região onde o veneno é inoculado. (Milani *et al.*, 1997). Estas miotoxinas caracterizam-se por induzir dano muscular localizado, de ação rápida, e pouca miotoxicidade adicional ocorre após esse dano inicial. Provavelmente as PLA₂ BanTX-I e BanTX-II, não tem especificidade e se ligam às células musculares e não musculares no lugar da injeção. Esta idéia concorda com a hipótese de ação diferenciada para miotoxinas que agem local ou sistemicamente proposta por Gutierrez e Ownby (2003) e a hipótese geral proposta por Kini e Evans (1989), pela qual se explica a especificidade farmacológica das PLA₂ de veneno. Estas PLA₂ miotóxicas locais unem-se predominantemente a diferentes tipos celulares, além de fibras musculares, e chegam a ser rapidamente sequestradas após injeção.

Por outro lado, as PLA₂ miotóxicas sistêmicas como as PLA₂ F6 e F6a de *Crotalus durissus collilineatus* (Gutierrez *et al.*, 2008) possuem alta seletividade para fibras musculares esqueléticas e não se unem às outras células. Esta especificidade permite às miotoxinas sistêmicas difundirem além do sítio de injeção, alcançando a corrente sangüínea e células musculares distantes, causando rhabdomiólise. Gutierrez e Ownby (2003), propõem que as PLA₂ miotóxicas ligam-se aos receptores da membrana plasmática (lipídios ou proteínas), podendo diferir sua afinidade pelas PLA₂. Ao se ligarem, estas PLA₂ miotóxicas produzem destruição da membrana plasmática através de mecanismos catalíticos ou mecanismos independentes de atividade PLA₂, provocando entrada de Ca²⁺ do fluido extracelular ao citosol, elevando rapidamente a concentração desse cátion. Tal influxo de Ca²⁺ inicia uma série de processos celulares degenerativos que levam à célula a “um ponto de não retorno”. As principais consequências do aumento de Ca²⁺ são: hipercontração de miofilamentos, alterações mitocondriais, ativação de PLA₂ citosólicas e proteases Ca²⁺-dependentes com as calpains (Montecucco *et al.*, 2008).

A especificidade do efeito miotóxico *in vivo* das PLA₂ de veneno tem sido atribuída à existência de sítios de ligação específicos na membrana plasmática de células musculares esqueléticas, mas sua natureza exata ainda é desconhecida. Algumas proteínas aceptoras de alta afinidade têm sido identificadas em tecido neuronal (Krizaj e Gubensek, 2000). Por outro lado, uma proteína de membrana multidomínio de 180 kDa conhecida como receptor tipo M foi caracterizada como um sítio de ligação para algumas PLA₂ do grupo I (PLA₂ isoladas de

Cobras) em músculo esquelético (Lambeau *et al.*, 1990). Entretanto, não existem evidências do envolvimento de receptores tipo M no efeito miotóxico pelas PLA₂ do grupo II (PLA₂ isoladas de serpentes botrópicas).

Alternativamente, as miotoxinas PLA₂ do grupo II poderiam atuar através de reconhecimento de lipídios de membrana, tais como glicerofosfolipídeos ou glicolipídeos que podem ser expressos diferencialmente em mioblastos e miotubos. Várias observações sugerem que fosfolipídios carregados negativamente podem ser aceptores importantes para o mecanismo miotóxico destas proteínas (Diaz *et al.*, 2001; Gutiérrez e Ownby 2003).

A miotoxicidade mostrada pelas PLA₂ homólogas K49 na ausência de atividade enzimática indica a existência de sítios farmacológicos (regiões moleculares), os quais seriam responsáveis pela atividade miotóxica. Assim, Lomonte *et al.* (1994), identificaram a região catiônica e hidrofóbica C-terminal no segmento (115 - 129) do sítio de ligação da heparina como o responsável pela atividade citotóxica das PLA₂ K49. O peptídeo responsável por este sítio é capaz de lesar células endoteliais, produzir um efeito bactericida *in vitro* e desencadear uma necrose induzida do músculo esquelético (Lomonte *et al.*, 1994; Gutiérrez e Lomonte, 1997; Lomonte *et al.*, 1999).

No presente trabalho se avaliou a resposta inflamatória local produzida pelo veneno total e pelas PLA₂ BanTX-I e BanTX-II de *B. andianus* através da formação de edema de pata em camundongos. Os resultados mostram que tanto o veneno total quanto as PLA₂ BanTX-I e BanTX-II induzem edema pronunciado na pata de camundongos. A atividade inflamatória na pata de camundongos foi tempo-dependente e atingiu a resposta máxima 1 h após inoculados. A formação de edema induzido pelas toxinas de *B. andianus* é similar a outros venenos de serpentes da família Viperidae incluindo *B. brazili* (Huancahuire-Vega *et al.*, 2009), *B. marajoensis* (Ponce-Soto *et al.*, 2010), *B. moojeni* (Calgarotto *et al.*, 2008) e *Lachesis muta muta* (Ferreira *et al.*, 2009). Os mecanismos envolvidos nos processos pro-inflamatórios desencadeados pelas toxinas poderiam agir de maneira diferente. Assim, a BanTX-I (PLA₂ homóloga K49) atuaria provavelmente através de uma região ou regiões cujos mecanismos são independentes da atividade catalítica (Kini e Evans, 1987, 1989, Kini 2003, Lomonte *et al.*, 2003, Ponce-Soto *et al.*, 2007, 2013). De outro lado, a BanTX-II (PLA₂ D49) poderia agir inicialmente através da atividade catalítica e depois a região ou regiões farmacológicas, aumentando o efeito farmacológico (Condrea *et al.*, 1981). Este fato foi

observado nos resultados, nos quais a BanTX-II evidencia um maior efeito inflamatório.

Todas as atividades farmacológicas induzidas pelas toxinas em estudo aconteceram na presença e na ausência de atividade enzimática e, como vimos, embora a atividade catalítica contribua para os efeitos farmacológicos, esta não é um requisito (Chaves *et al.*, 1998; Landucci *et al.*, 2000; Kanashiro *et al.*, 2002). Estudos adicionais são necessários para identificar os determinantes estruturais envolvidos nestas atividades biológicas.

Alguns autores propõem vários modelos para explicar a relação da atividade PLA₂ e as atividades farmacológicas (Kini, 2003; Gutierrez e Ownby, 2003; Ponce-Soto *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2008). Nestes modelos propostos, as PLA₂ possuem dois sítios separados, um responsável pela atividade catalítica e outro pela expressão da atividade biológica que pode ser observado também no caso da BanTX-I e a BanTX-II.

Tentar determinar os fatores responsáveis das atividades farmacológicas, com base nas comparações das sequências e na distribuição característica de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, auxilia no entendimento da presença de domínios para tais efeitos farmacológicos. No entanto, é preciso ter todas estas informações ligadas com outras características físico-químicas de estudos cristalográficos, dicroísmo circular ou mutagênese dirigida. Todos estes dados nos permitem conhecer e entender melhor estas proteínas (Kini e Iwanaga, 1986; Kini e Evans, 1987; Arni e Ward, 1996).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

- BanTX-I e BanTX-II são duas fosfolipases A₂ que exibem as principais ações tóxicas reportadas para esta família de proteínas, tais como, atividade miotóxica local e inflamatória *in vivo*, possuindo provavelmente um papel principal no envenenamento por *B. andianus*.
- Ao longo da caracterização físico-química estas duas toxinas mostraram diferenças estruturais. A BanTX-I tem massa molecular de 13712 Da, não possui atividade catalítica e a presença de um resíduo de Lys na posição 49 revela que pertence à família das PLA₂ homólogas K49. Por outro lado, a BanTX-II possui massa molecular de 13693 Da, resíduo Asp na posição 49 na estrutura primária revela que pertence à família PLA₂ e é enzimaticamente ativa, dependente de Ca²⁺, atividade ótima em pH 8 e em temperatura entre 35 - 40°C. Na presença do substrato NOAB mostra tendência alostérica, principalmente em baixas concentrações.
- A PLA₂ BanTX-II (D49) e a homóloga BanTX-I (K49), mostraram ser miotoxinas com atividade inflamatória independentemente da atividade catalítica para a BanTX-I. Esses resultados apoiam a hipótese da existência de regiões moleculares distintas da catalítica que são as responsáveis pelos eventos farmacológicos (miotoxicidade e atividade inflamatória) apresentados tanto pelas PLA₂ homólogas K49 quanto pelas PLA₂.

7. BIBLIOGRAFIA

- Angulo, Y. and Lomonte, B. (2005). Differential susceptibility of C2C12 myoblasts and myotubes to group II phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms. *Cell Biochemistry and Function* 23(5), 307-313.
- Angulo, Y. and Lomonte, B. (2009). Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 54, 949-957.
- Arni, R.K. and Ward, R.J. (1996). Phospholipase A₂ - A structural review. *Toxicon* 34(8), 827-841.
- Beghini, D.G.; Toyama, M.H.; Hyslop, S.; Sodek, L.C.; Novello, J.C. and Marangoni, S. (2000). Enzymatic characterization of a novel phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (maracamboia) venom. *Journal of Protein Chemistry* 19(8), 679-684.
- Breithaupt, H. (1976). Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A₂ and the crotoxin complex. *Toxicon* 14, 221-233.
- Bonfim, V.L.; Ponce-Soto, L.A.; Novello, J.C. e Marangoni, S. (2006). Structural and functional properties of Cr 5, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Calloselasma rhodostoma*. *The Protein Journal* 25, 492-502.
- Bustillo, S.; Gay, C.C.; García-Denegri, M.E.; Ponce-Soto, L.A.; de Kier, E.B.; Acosta, O. and Leiva, L.C. (2012). Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA₂ from *Bothrops alternatus* venom on skeletal muscle (C2C12) cells. *Toxicon* 59, 338-343.
- Calgarotto, A.K.; Damico, D.C.; Ponce-Soto, L.A.; Baldasso, P.A.; Da Silva, S.L.; Souza, G.H.; Eberlin, M.N. and Marangoni, S. (2008). Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A₂ BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 51, 1509-1519.
- Calvete, J.J.; Sanz, L.; Angulo, Y.; Lomonte, B. and Gutiérrez, J.M. (2009). Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Letters* 583, 1736-1743.
- Campbell, J.A. and Lamar, W. (1989). The venomous reptiles of Latin America. Cornell University Press. Ithaca, New York.
- Campbell, J.A. and Lamar, W. (2004). The venomous reptiles of the Western Hemisphere. Comstock Publishing Associates. Ithaca, New York.
- Carredano, E.; Westerlund, B.; Persson, B.; Saarinen, M.; Ramaswamy, S.; Eaker, D. and Eklund, H. (1998). The three-dimensional structure of two toxins from snake venom

- throw light on the anticoagulant and neurotoxic sites of phospholipase A₂. *Toxicon* 36(1), 75-92.
- Chang, L.S.; Lin, S.R. and Chang, C.C. (1996). The essentiality of calcium ion in the enzymatic activity of Taiwan cobra phospholipase A₂. *Journal of Protein Chemistry* 15, 701-707.
- Chaves, F.; Leon, G.; Alvarado, V.H. and Gutiérrez, J.M. (1998). Pharmacological modulation of edema induced by Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 36, 1861-1869.
- Chioato, L. and Ward, R.J. (2003). Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. *Toxicon* 42, 869-883.
- Cho, W. and Kezdy, F.J. (1991). Chromogenic substrates and assay of phospholipases A₂. *Methods in Enzymology* 197, 75-79.
- Chu, Y.P.; Cheng, Y.C.; Yang, C.C. and Chang, L.S. (2005). The structural events associated with the binding of divalent cations to beta-bungarotoxin. *Toxicon* 45, 139-145.
- Cintra, A.C.O.; Marangoni, S.; Oliveira, B. and Giglio, J.R. (1993). Bothropstoxin-I: Amino acid sequence and function. *Journal of Protein Chemistry* 12(1), 57-64.
- Condrea, E.; Fletcher, J.E.; Rapuano, B.E.; Yang, C.C. and Rosenberg, P. (1981). Dissociation of enzymatic activity from lethality and pharmacological properties by carbamylation of lysines in *Naja nigricollis* and *Naja naja atra* snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* 19(5), 705-720.
- Dennis, E.A. (1994). Diversity of groups types, regulation and function of phospholipase A₂. *Journal of Protein Chemistry* 269, 13057-13060.
- Dennis, E.A.; Cao, J.; Hsu, Y.H.; Magrioti, V. and Kokotos, G. (2011). Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chemical Reviews* 111, 6130-6185.
- Diaz, C.; Leon, G.; Rucavado, A.; Rojas, N.; Schroit, A.J. and Gutiérrez, J.M. (2001). Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxic phospholipases A₂; role negatively charged phospholipids as potential membrane binding sites. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 391(1), 56-64.
- Ferreira, T.; Camargo, E.A.; Ribela, M.T.; Damico, D.C.; Marangoni, S.; Antunes, E.; De Nucci, G. and Landucci, E.C. (2009). Inflammatory oedema induced by *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom and LmTX-I in the rat paw and dorsal skin. *Toxicon* 53, 69-77.

- Fletcher, J.E.; Hubert, M.; Wieland, S.J.; Gong, Q. and Jiang, M. (1996). Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. *Toxicon* 34(11), 1301-1311.
- Fox, J.W. and Serrano, S.M.T. (2009). Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *Journal of Proteomics* 72, 200-209.
- Francis, B.; Gutierrez, J.M.; Lomonte, B. and Kaiser, I.I. (1991). Myotoxin II from *Bothrops asper* (terciopelo) venom is a lysine 49 phospholipase A₂. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 284(2), 352-359.
- Fuly, A.L.; Calil-Elias, S.; Zingali, R.B.; Guimarães, J.A. and Melo, P.A. (2000). Myotoxic activity of an acidic phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Toxicon* 38, 961-972.
- Garcia-Denegri, M.E.; Acosta, O.C.; Huancahuire-Vega, S.; Martins-de-Souza, D.; Marangoni, S.; Maruñak, S.L.; Teibler, G.P.; Leiva, L.C. and Ponce-Soto, L.A. (2010). Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. *Toxicon* 56, 64-74.
- Gutiérrez, J.M. and Lomonte, B. (1997). Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini R.M, (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, England 321-352.
- Gutiérrez, J.M. and Lomonte, B. (2003). Efeitos locais no envenenamento ofídico na America Latina-Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Ed. Sarvier-SP. 32, 310-323.
- Gutierrez, J.M. and Lomonte, B. (1995). Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33(11), 1405-1424.
- Gutiérrez, J.M. and Ownby, C.L. (2003). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42(8), 915-931.
- Gutiérrez, J.M.; Ponce-Soto, L.A.; Marangoni, S. and Lomonte, B. (2008). Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II Phospholipases A₂: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA₂ homologue. *Toxicon* 51(1), 80-92.
- Gutiérrez, J.M.; Theakston, R.D.G. and Warrel, D.A. (2006). Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. *PLoS Medicine* 3(6), 727-731.
- Gutiérrez, J.M.; Williams, D.; Fan, H.W. and Warrell, D.A. (2010). Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon* 56, 1223-1235.

- Hanada, K.; Kinoshita, E.; Itoh, M.; Hirata, M.; Kajiyama, G. and Sugiyama, M. (1995). Human pancreatic phospholipase A₂ stimulates the growth of human pancreatic cancer cell line. *FEBS Letters*. 373, 85-87.
- Holland, D.R.; Clancy, L.L.; Muchmore, S.W.; Rydel, T.J.; Einspahr, H.M.; Finzel, B.C.; Heinrickson, R.L. and Watenpaugh, K.D. (1990). The crystal structure of a Lysine 49 phospholipase A₂ from the venom of the Cottonmouth snake to 2.0 Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry* 265(29), 17649-17656.
- Holzer, M. and Mackessy, S.P. (1996). An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* 34(10), 1149-1155.
- Huancahuire-Vega, S.; Ponce-Soto, L.A.; Martins-de-Souza, D. and Marangoni, S. (2009). Structural and functional characterization of brazilitoxins II and III (BbTX-II and III), two myotoxins from the venom of *Bothrops brazili* snake. *Toxicon* 54, 818-827.
- Janssen, M.J.W.; van de Wiel, W.A.E.C.; Beiboer, S.H.W.; van Kampen, M.D.; Verheij, H.M.; slotboom, A.J. and Egmond, M.R. (1999). Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A₂ probed by the variants H48Q, H48N and H48K. *Protein Engineering* 12(6), 497-503.
- Kanashiro, M.M.; Escocard, R.C.M.; Petretski, J.H.; Prates, M.V.; Alves, W.; Machado, O.L.T.; Diaz da Silva, W. and Kipnis, T.L. (2002). Biochemical and biological properties of phospholipases A₂ from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochemical and Pharmacology* 64, 1179-1186.
- Kasturiratne, A.; Wickremasinghe, A.R. and de Silva, N. (2008). The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Medicine* 5(11), 1591-1604.
- Kini, R.M. (1997). Phospholipase A₂: a complex multifunctional protein puzzle in: R.M. Kini (Ed), *Venom Phospholipase A₂ enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester 1-28.
- Kini, R.M. (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon* 42, 827-840.
- Kini, R.M. and Evans, H.J. (1987). Structure-function relationships of phospholipases: The anticoagulant region of phospholipases A₂. *The Journal of Biological Chemistry* 262, 14402-14407.
- Kini, R.M. and Evans, H.J. (1989). A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* 27, 613-635.

- Kini, R.M.; and Iwanaga, S. (1986). Structure function relationships of phospholipases II: charge density distribution and themyotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* 24, 895-905.
- Koh, D.C.; Armugam, A. and Jeyaseelan, K. (2006). Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Science* 63, 3030-3041.
- Krizaj, I. and Gubensek, F. (2000). Neuronal receptors for phospholipases A₂ and β -neurotoxicity. *Biochimie* 82, 807-814.
- Krizaj, I.; Bieber, A.L.; Ritonja, A. and Gubensek, F. (1991). The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Vipera ammodytes* venom. *European Journal of Biochemistry* 202, 1165-1168.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259), 680-685.
- Lambeau, G.; Schmid-Alliana, A.; Lazdunski, M. and Barhanin, J. (1990). Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A₂ in skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry* 265, 9526-9532.
- Landucci, E.C.T.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Benedito, O.; Giuseppe, C.; Antunes, E. and de Nucci, G. (2000). Effect of crotafotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A₂. *Toxicon* 38, 199-208.
- Lomonte, B.; Angulo, Y. and Calderón, L. (2003). An overview of Lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 42, 885-901.
- Lomonte, B.; Angulo, Y.; Rufini, S.; Cho, W.; Giglio, J.R.; Ohno, M.; Daniele, J.J.; Geoghegan, P. and Gutiérrez, J.M. (1999). Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipase A₂ on the biological activities of the Asp49-phospholipases A₂s from snake venom. *Protein Peptide Letters* 16, 852-859.
- Lomonte, B.; Moreno, E.; Tarkowski, A.; Hanson, L.A. and Maccarana, M. (1994). Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 29867-29873.
- Magro, A.J.; Fernandes, C.A.H.; dos Santos, J.I. and Fontes, M.R.M. (2009). Influence of quaternary conformation on the biological activities of the Asp49-phospholipases A₂s from snake venoms. *Protein and Peptide Letters* 16, 852-859.
- Maraganore, J.M.; Merutka, G.; Cho, W.; Welches, W.; Kezdy, F.J. and Heinrickson, R.L. (1984). A new class of phospholipase A₂ with lysine in place of aspartate 49. *The Journal of Biological Chemistry* 259(22), 13839-13843.

- Markland, F.S. (1998). Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36(12), 1749-1800.
- Matsui, T.; Fujimura, Y. and Titani, K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477, 146-156.
- Mazzi, M.V.; Marcussi, S.; Carlos, G.B.; Stabelic, R.G.; Frnco, J.J.; Cintra, A.C.O.; Franc, S.C.; Soares, A.M. and Sampaio, S.V. (2004). A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. *Toxicon* 44, 215-223.
- Mezna, M.; Ahmad, T.; Chettibi, S.; Drainas, D. and Lawrence, A.J. (1994). Zinc and barium inhibit the phospholipase A₂ from *Naja naja atra* by different mechanisms. *The Biochemical Journal* 301, 503-508.
- Milani, R.; Jorge, M.T.; Ferraz de Campos, F.P.; Martins, F.P.; Bousso, A.; Cardoso, J.L.C.; Ribeiro, L.A.; Fan, H.W.; Franca, F.O.S.; Sano-Martins, I.S.; Cardoso, D.; Fernandez, I.C.O.; Fernandes, J.C.; Aldred, V.L.; Sandoval, M.P.; Puerto, G.; Theakston, R.D.G. and Warrell, D.A. (1997). Snake bites by the jararacucu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in Sao Paulo state, Brazil. *The Quarterly Journal of Medicine* 90, 323-334.
- Montecucco, C.; Gutiérrez, J.M. and Lomonte, B. (2008). Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cellular and Molecular Life Science* 65, 2897-2912.
- Ownby, C.L.; Selistre de Araújo, H.S.; White, S.P. and Fletcher, J.E. (1999). Lysine 49 phospholipase A₂ proteins Review. *Toxicon* 37, 411-445.
- Pereañez, J.A.; Nuñez, V.; Huancahuire-Vega, S.; Marangoni, S. and Ponce-Soto, L.A. (2009). Biochemical and biological characterization of a PLA₂ from crotoxin complex of *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon* 53, 534-542.
- Perumal, S.R.; Gopalakrishnakone, P.; Ho, B. and Chow, V.T. (2008). Purification, characterization and bactericidal activities of basic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys* (Chinese pallas). *Biochimie* 90, 1372-1388.
- Ponce-Soto, L.A.; Bonfim, V.L.; Rodrigues-Simioni, L.; Novello, J.C. and Marangoni, S. (2006). Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA₂ D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using *in vitro* neuromuscular preparation. *The Protein Journal* 25(2), 147-155.
- Ponce-Soto, L.A. Leiva, L. Landucci, E.C. (2013). Understanding the molecular mechanism and structure-function relationship of the toxicity of PLA₂ and K49 homologs in snake venom. *BioMed Research International* 2013, 1-2.

- Ponce-Soto, L.A.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M.; Rodrigues-Simioni, L.; Novello, J.C. and Marangoni, S. (2007). Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1770, 585-593.
- Ponce-Soto, L.A.; Martins-de-Souza, D. and Marangoni, S. (2010). Neurotoxic, myotoxic and cytolytic activities of the new basic PLA₂ Isoforms BmjeTX-I and BmjeTX-II isolated from the *Bothrops marajoensis* (Marajó Lancehead) snake venom. *The Protein Journal* 29, 103-113.
- Ponce-Soto, L.A.; Toyama, M.H.; Hyslop, S.; Novello, J.C. and Marangoni, S. (2002). Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Journal of Protein Chemistry* 21(3), 131-136.
- Randazzo-Moura, P.; Ponce-Soto, L.A.; Rodrigues-Simioni, L. e Marangoni, S. (2008). Structural characterization and neuromuscular activity of a new Lys49 phospholipase A₂ homologous (Bp-12) isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *The Protein Journal* 27, 255-362.
- Rucavado, A.; Lomonte, V.; Obadia, M. and Gutierrez, J.M. (1995). Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. *Experimental Molecular Pathology* 63, 186-199.
- Rufini, S.; Cesaroni, M.; Balestro, N. and Luly, P. (1996). Proliferative effect of ammodytin L from the venom of *Vipera ammodytes* on 208F rat fibroblasts in culture. *The Biochemical Journal* 320, 467-472.
- Schneider, F.S.; Starling, M.C.; Duarte, C.G.; Machado de Avila, R.; Kalapothakis, E.; Silva Suarez, W.; Tintaya, B.; Flores Garrido, K.; Seraylan Ormachea, S.; Yarleque, A.; Bonilla, C. and Chávez-Olórtegui, C. (2012). Preclinical testing of Peruvian anti-bothropic anti-venom against *Bothrops andianus* snake venom. *Toxicon* 60, 1018-1021.
- Scott, D.L.; White, S.P.; Otwinowski, Z.; Yuan, W.; Gelb, M.H. and Sigler, P.B. (1990). Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. *Science* 250, 1541-1546.
- Scott, D.L. (1997). Phospholipase A₂ structure and catalytic properties. In *Venom phospholipase A₂ enzymes: Structure, function and mechanism*, Kini, R.M. Chichester, England: John Wiley & Sons. 97-128.
- Selistre de Araújo, H.S.; White, S.P. and Ownby, C.L. (1996). Sequence analysis of Lys 49 phospholipase A₂ myotoxins: a highly conserved class of protein. *Toxicon* 34(11), 1237-1242.
- Shiomi, K.A.; Kazama, A.; Shimakura, K. and Nagashima, Y. (1998). Purification and properties of phospholipases A₂ from the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) venom. *Toxicon* 36(4), 589-599.

- Soares, A.M.; Andrião-Escarso, S.H.; Bortoleto, R.K.; Rodrigues-Simioni, L.; Arni, R.K.; Ward, R.J.; Gutierrez, J.M. and Giglio, J.R. (2001). 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* 387(2), 188-196.
- Teixeira, C.F.P.; Landucci, E.C.T.; Antunes, E.; Chacur, M. and Cury, Y. (2003). Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon* 42, 947-962.
- Torres-Huaco, F.D.; Ponce-Soto, L.A.; Martins-de-Souza, D. and Marangoni, S. (2010). Purification and characterization of a new weak hemorrhagic metalloproteinase BmHF-1 from *Bothrops marajoensis* snake venom. *The Protein Journal* 29(6), 407-416.
- Valentin, E. and Lambeau, G. (2000). What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂? *Biochimie* 82, 815-831.
- Valeriano-Zapana, J.A.; Segovia-Cruz, F.S.; Rojas-Hualpa, J.M.; Martins-de-Souza, D.; Ponce-Soto, L.A. and Marangoni, S. (2012). Functional and structural characterization of a new serine protease with thrombin-like activity TLBan from *Bothrops andianus* (Andean Lancehead) snake venom. *Toxicon* 59, 231-240.
- Verheij, H.M.; Vowerk, J.J.; Jasen, E.H.J.M.; Puyk, W.C.; Dýkstra, B.W.; Drenth, J. and Hass, G.H. (1980). Methylation of Histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂, role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry* 19,743-748.
- Vija, H.; Samel, M.; Siigur, E.; Aaspõllu, A.; Trummal, K.; Tõnismägi, K.; Subbi, J. and Siigur, J. (2009). Purification, characterization, and cDNA cloning of acidic platelet aggregation inhibiting phospholipases A₂ from the snake venom of *Vipera lebetina* (Levantine viper). *Toxicon* 54, 429-439.
- Ward, R.J.; de Azevedo Jr, W.F. and Arni, R.K. (1998). At the interface: crystal structures of phospholipases A₂. *Toxicon* 36(11), 1623-2633.
- Wilton, D.C. 2005. Phospholipases A₂: structure and function. *European Journal of Lipid Science and Technology* 107, 193-205.
- World Health Organization, 2007. Rabies and Envenomings. A neglected public health issue. Geneva.
- Yang, C.C. (1994). Structure-function relationship of phospholipase A₂ from snake venoms. *Journal of Toxicology* 13(2), 125-177.
- Yu, B.Z.; Berg, O.G. and Jain, M.K. (1993). The divalent cation is obligatory for the binding of ligands to the catalytic site of secreted phospholipase A₂. *Biochemistry* 32, 6485-6492.

8. ANEXO



CEUA/Unicamp

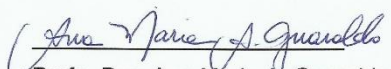
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

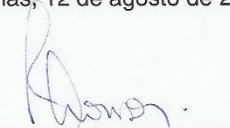
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Miotoxinas fosfolipases A2 (PLA2) D49 e K49 purificadas a partir do veneno de Bothrops andianus: Caracterização bioquímica e avaliação das atividades miotóxica, neurotóxica e inflamatória" (protocolo nº 3123-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Sergio Marangoni / José Miguel Rojas Hualpa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 12 de agosto de 2013.

Campinas, 12 de agosto de 2013.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>