

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



*Vera Lucia Bonfim*

**“Estudos Estrutura-Função de Fosfolipases A<sub>2</sub> D49 e K49 Homóloga  
Isoladas do Veneno *Bothrops jararacussu* e *Calloselasma  
rhodostoma*. Análise Comparativa Estrutural e Biológica”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Vera Lucia Bonfim*  
*Sérgio Marangoni*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual  
de Campinas para obtenção do  
Título de Doutor em Biologia  
Funcional e Molecular, na área de  
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Marangoni

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

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

<b>B641e</b>	<p>Bonfim, Vera Lucia</p> <p>Estudos estrutura-função de fosfolipase A<sub>2</sub> D49 e K49 homólogas isoladas do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Calloselasma rhodostoma</i>. Análise comparativa: estrutural e biológica / Vera Lucia Bonfim. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientadores: Sérgio Marangoni, Luis Alberto Ponce-Soto.</p> <p>Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Fosfolipase A<sub>2</sub>. 2. <i>Bothrops jararacussu</i>. 3. <i>Calloselasma rhodostoma</i>. 4. Citotoxicidade. I. Marangoni, Sérgio. II. Ponce-Soto, Luis Alberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	--

**Título em inglês:** Studies structure-function of phospholipase A<sub>2</sub> D49 and K49 homologue purified from *Bothrops jararacussu* and *Calloselasma rhodostoma* venom. Analysis comparative: structure and function.

**Palavras-chave em inglês:** Phospholipase A<sub>2</sub>; *Bothrops jararacussu*; *Calloselasma rhodostoma*; Cytotoxicity.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Sérgio Marangoni, Jose Carlos Cogo, Claudio Chrysostomo Werneck, Adélia Cristina Oliveira Cintra, Daniela Diógenes de Carvalho.

**Data da defesa:** 25/02/2008.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 25 de Fevereiro de 2008

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Sérgio Marangoni (Orientador)

  
Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

  
Assinatura

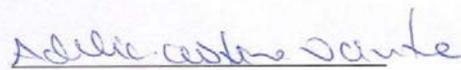
Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

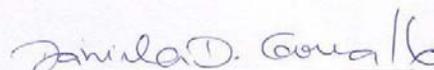
Prof. Dr. José Carlos Cogo

  
Assinatura

Profa. Dra. Adélia Cristina Oliveira Cintra

  
Assinatura

Profa. Dra. Daniela Diógenes de Carvalho

  
Assinatura

Profa. Dra. Andrea Balan

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Lea Rodrigues Simioni

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## **Dedicatória**

**A Deus pela Vida!!**

Aos meus pais, quanto carinho e atenção, crédito e amor. OBRIGADA de todo coração, Amo Vocês.

Aos meus queridos irmãos, obrigada por estarem ao meu lado, sempre! Minha vida é muito mais feliz com vocês por perto. Amo todos.

**“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano”.**

**Issac Newton.**

## **Agradecimentos.**

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela formação acadêmica e também pessoal, me orgulho de ter passado por aqui.

A Capes pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Sergio Marangoni, meu orientador e Prof do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade e confiança.

Ao co-orientador e principalmente amigo, Luis Alberto Ponce-Soto, quantas discussões, erros e acertos desde o início deste trabalho, mas, principalmente quantos sorrisos, risadas e companheirismo desde a minha iniciação científica até agora. Obrigada!!

Aos professores da Banca: prof. Dr. Cláudio Werneck, Dr Jose Carlos Cogo, Dra Adélia Cristina Oliveira Cintra e Dra Daniela Diógenes de Carvalho, pela presença, pelos conselhos e por contribuírem com a correção do trabalho, obrigada.

Ao técnico e amigo, Paulo Ap. Baldasso pelo apoio técnico sempre que necessário e pelo constante bom humor.

Ao meu querido Ricardo, pelo simples fato de estar ao meu lado me incentivando, amando, como foi bom conhecê-lo, como você é especial para mim. Obrigada.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica, especialmente do LAQUIP, pela amizade e convivência durante essa jornada, em especial aos de longa data, Frey Francisco, Eduardo Brito, Augusto Vilca, Andrana Karla, Daniela Damico e aos mais novos, Salomón e Frank. Obrigada.

A todos os amigos de hoje, de ontem e de sempre, que me chamam de Verocas, de Verinha e que direta ou indiretamente, me acompanharam durante este trabalho, obrigada! Amigo é assim, ouve com paciência, fala com liberdade.

Aos docentes, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia UNICAMP, obrigada.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>RESUMO</b>	<b>vii-viii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>ix-x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1-10</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODO</b>	<b>13-18</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>19-33</b>
<b>5. DISCUSSÃO GERAL:</b>	<b>34</b>
<b>DISCUSSÃO:</b>	
<b>CAPITULO 1 – PURIFICAÇÃO DE FOSFOLIPASES A<sub>2</sub> DO VENENO BRUTO DE <i>Calloselasma rhodostoma</i> (Cr-IV1 e Cr 5) E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA PLA<sub>2</sub> D49 (Cr-IV1) E K49 (Cr 5).</b>	<b>36-44</b>
<b>CAPITULO 2 – CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS PLA<sub>2</sub> D49 (6-1, 6-2 e Cr-IV1) e K49 (Bj-VII e Cr 5).</b>	<b>46-58</b>
<b>CAPITULO 3 – PRODUTOS DA TESE</b>	
<b>3.1-</b> Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA <sub>2</sub> D49 from <i>Bothrops jararacussu</i> snake venom and neurotoxic characterization using in vitro neuromuscular preparation.	<b>60-68</b>
<b>3.2-</b> Structural and functional properties of Cr 5, a new Lys49 phospholipase A <sub>2</sub> homologue isolated from the venom of the snake <i>Calloselasma rhodostoma</i> .	<b>69-79</b>
<b>3.3-</b> Structural and functional characterization of myotoxin, Cr-IV 1, a phospholipase A <sub>2</sub> D49 from the venom of the snake <i>Calloselasma rhodostoma</i> .	<b>80-88</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>89-90</b>
<b>7. ANEXO</b>	<b>91</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>92-103</b>

## Resumo:

O envenenamento ofídico é um evento comum nos países pobres da área tropical e subtropical e as conseqüências deste, muito graves. Nestes países, pequena têm sido a valorização destas conseqüências, sendo pouco registradas estatisticamente como casos de saúde pública e muitas vezes tratados com procedimentos pouco efetivos ou ultrapassados.

Neste trabalho foram utilizados metodologias refinadas e protocolos otimizados de purificação em HPLC com o intuito de se estudar mais detalhadamente a composição do veneno de duas serpentes de importância médica e epidemiológica, *Bothrops jararacussu* e *Calloselasma rhodostoma*, e analisar a relação estrutura função de PLA<sub>2</sub> D49 (6-1, 6-2 e Cr-IV1) e PLA<sub>2</sub> homólogas K49 (Bj-VII e Cr 5).

A *Bothrops jararacussu*, é uma serpente encontrada nas Américas, desde o México até a Argentina sendo que no Brasil cerca de 90% dos acidentes ofídicos são causados pelo gênero *Bothrops*. A *Calloselasma rhodostoma*, é uma serpente amplamente distribuída no sudeste da Ásia e é a causa mais comum de acidentes ofídicos na Malásia e Tailândia.

As novas toxinas foram obtidas com alto grau de pureza e homogeneidade molecular, como mostram os perfis cromatográficos, eletroforéticos e de espectrometria de massa por MALDI-TOF.

A nova PLA<sub>2</sub> D49 foi purificada do veneno de *Calloselasma rhodostoma* após dois passos cromatográficos: exclusão molecular em uma coluna Protein Pack SW 300 (0,78 cm x 3,30 cm), eluída com 0,25M de bicarbonato de amônio, pH 7,9, a um fluxo de 0,3 ml/min e, fase reversa em HPLC usando uma coluna  $\mu$ -Bondapack C-18. Esta apresentou atividade fosfolipásica de 14,25 $\pm$ 0,36 nmol/mg/min na presença de substrato sintético cromogênico (4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoic acid), massa molecular de 14,029 Da determinada através de espectrometria de massa por MALDI-TOF, valor calculado de pI igual a 8.55, caráter básico e grande homologia seqüencial evidenciada pela estrutura primária quando esta é comparada com outras PLA<sub>2</sub> D49 provenientes de veneno de serpente.

A outra proteína, denominada Cr 5, uma PLA<sub>2</sub> homóloga K49 foi isolada do veneno de *Calloselasma rhodostoma* em um único passo cromatográfico de fase reversa em HPLC ( $\mu$ -Bondapack C-18). A massa molecular de 13,965 Da foi

determinada através de espectrometria de massa por MALDI-TOF. A composição de aminoácido mostrou que a Cr 5 tem alto conteúdo de Lys, Tyr, Gly, Pro e 14 cisteínas, resíduos típicos de uma PLA<sub>2</sub> básica. A completa seqüência de aminoácidos da Cr 5 contém 120 resíduos e mostra alta identidade quando comparada a outras PLA<sub>2</sub> K49 isoladas de venenos de serpentes da família viperidae.

Com relação à caracterização biológica, esta foi realizada também com as isoformas 6-1 e 6-2 (provenientes da fração BthTX-II de *Bothrops jararacussu*) e com a PLA<sub>2</sub> K49 Bj-VII, estas purificadas e parcialmente caracterizadas em trabalho anterior.

As PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 e Cr-IV 1, exibiram miotoxicidade local e na dosagem de 40 µg/150 µl a 6-1 causou 83,06% de citotoxicidade em miotubos e 93,78% em mioblastos, já a 6-2 75,12 % em miotubos e 86,26% em mioblastos e a Cr-IV 1, 91,50% e 88,40% de citotoxicidade em miotubos e mioblastos, respectivamente. O efeito citotóxico também foi visto em fibroblastos mostrando na dosagem de 5 µM (linhagem 3T3) 85,63%, 86% e 91,34% de citotoxicidade na presença de 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 respectivamente, e na linhagem COS7, 95,42%, 95,07% e 96,42% respectivamente, além de atividade inflamatória, sendo esta mais pronunciada na presença da Cr-IV 1.

As PLA<sub>2s</sub> K49 homólogas, Bj-VII e Cr 5, evidenciaram miotoxicidade local e na dosagem de 40 ug/150 µl, a Bj-VII causou 87±50% de lise em mioblastos e 84±85% em miotubos e 91±25% de lise em mioblastos e 91±0.8 % em miotubos quando em contato com a Cr 5, além de atividade inflamatória evidenciada pela indução de edema. No caso destas proteínas, todos os efeitos biológicos induzidos por elas ocorreram na ausência de atividade fosfolipásica mensurável *in vitro*, suportando a idéia proposta pela literatura de mecanismos catalíticos e farmacológicos independentes.

Apesar de todas apresentarem algumas diferenças biológicas, elas possuem um comportamento semelhante na estrutura-função, sugerindo uma ancestralidade comum embora sejam proteínas provenientes de venenos de serpentes separadas geograficamente.

## Abstract:

Snake poisoning is a common event in poor countries of tropical and subtropical areas and the consequences of this is very serious. In these countries, there is the valorization of these consequences, due to few registers of published health cases and a lot of times treated with procedures a little effective or outdated.

In this work we refined methodologies and optimized purification protocols used in HPLC with the intention to study the composition of the venom of two serpents of epidemic importance, *Bothrops jararacussu* and *Calloselasma rhodostoma*, and to analyze the relationship of structures function of PLA<sub>2</sub> D49 (6-1, 6-2 and Cr-IV1) and homologous PLA<sub>2</sub> K49 (Bj-VII and Cr 5).

*Bothrops jararacussu* is a serpent found in America, from Mexico to Argentina being in Brazil, about 90% of the snake accidents caused by *Bothrops* genus. *Calloselasma rhodostoma* is a serpent thoroughly distributed at the Southwest of Asia and it is the most common cause of snake accidents in Malaysia and Thailand.

The new toxins were obtained with high degree of purity and molecular homogeneity, like showed the chromatographics profiles, electrophoresis and MALDi-tof mass spectrometric (MS) analysis.

A new D49 PLA<sub>2</sub> was purified from the venom of *Calloselasma rhodostoma* after two chromatographic steps; molecular exclusion was loaded onto a Protein-Pack 300 SW column (0.78 cm 3 30 cm) and eluted with 0.25 M ammonium bicarbonate, pH 7.9, at a flow rate of 0.3 ml/min and reverse phase HPLC on  $\mu$ -Bondapack C-18 and showed phospholipasic activity of  $14.25 \pm 0.36$  nmol/mg/min in the presence of a synthetic chromogenic substrate (4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoic acid), a molecular mass of 14.029 Da was determined by MALDI-TOF mass spectrometry, calculated *pI* value 8.55, basic character and great sequential homology evidenced by the primary structure when this was compared with other PLA<sub>2</sub> from D49 snake venom.

The other protein, denominated Cr 5 PLA<sub>2</sub> homologous (K49) was isolated from *Calloselasma rhodostoma* venom in one chromatographic step in reverse phase HPLC (RP-HPLC) (on I-Bondapack C-18). A molecular mass of 13.965 Da was determined by MALDI-TOF mass spectrometry. The amino acid composition showed that Cr 5 had a high content of Lys, Tyr, Gly, Pro, and 14 half-Cys residues, typical residues of a basic PLA<sub>2</sub>. The complete amino acid sequence of Cr 5 PLA<sub>2</sub> contains 120 residues and this

sequence shows high identity values when compared to other K49 PLA<sub>2s</sub> isolated from the venoms of viperid snakes.

In relation with biological characterization, this was also done with the isoforms 6-1 and 6-2 (from fraction BthTX-II of *Bothrops jararacussu*) and with PLA<sub>2</sub> K49 Bj-VII, these purified and partially characterized in The Masters.

PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 and Cr-IV 1 exhibited in mice local myonecrosis and edema upon intramuscular and intravenous injections, respectively. In dosage of 40 ug/150 ml, 6-1 showed 83.06% of citotoxicity in myotubes and 93.78% in myoblasts, 6-2 showed 75,12 % in myotubes and 86,26% in myoblasts, to Cr-IV 1 91.50% and 88.40% of citotoxicity in myoblasts and myotubes respectively. The citotoxic effect also in fibroblasts (cell line 3T3 and COS7) and in dosage de 5 µM (cell line 3T3) 85.63%, 85% and 91.34% of citotoxicity in the presence of 6-1, 6-2 and Cr-IV 1 respectively, and lineage COS7, 95.42%, 95.07 and 96.42% respectively, besides inflammatory activity, being this one more pronounced in the presence of the Cr-IV 1.

PLA<sub>2</sub> homologue K49, Bj-VII and Cr 5, evidenced local myotoxicity and in dosage of 40 ug/150 ml, showed 87±50 of lise in myoblasts and 84±85 in myotubes and 91±25% and 91±0.8 % when in contact with Bj-VII and Cr 5, respectively besides of inflammatory activity evidenced by the edema induction.

In the case of PLA<sub>2</sub> K49 (Bj-VII and Cr 5), all of the biological effects induced by them happened in the absence of activity phospholipase measurable in vitro, supporting the idea proposed by the literature of catalytic and pharmacological mechanisms independent.

Even though all show some kind of biologic differences all of them have a similar behave in function and structure which suggests a common ascendance of course we know they are proteins coming from different snakes geographic separated.

# INTRODUÇÃO

# 1. Introdução:

## 1.1 Aspectos Gerais:

As serpentes pertencem à classe dos répteis, ordem dos escamados e sub ordem das serpentes (ofídios) (Vizotto, 2003).

O veneno de serpente é uma mistura complexa contendo diversos componentes protéicos ou também chamados substâncias complexas (Oxidoredutases, Hidrolases/Proteases, Glicosidases, e Lipases (PLA<sub>2</sub>)).

As Proteases (proteinases, peptidases ou enzimas proteolíticas) por exemplo, são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. Estas enzimas são consideradas Hidrolases pois utilizam água no processo de clivagem proteolítica. As peptidases formam uma grande família, dividida em endopeptidases ou proteinases e exopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. Endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N- e C-terminal e as exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região N- ou C terminal.

Em geral elas são dependentes de íons metálicos como o cálcio, cobre, ferro e zinco como as metaloproteases (Bjarnason & Fox, 1994). Nos venenos são várias as proteases encontradas, como a rhodostoxina, a maior protease hemorrágica proveniente da serpente *Calloselasma rhodostoma* (Chung et al., 1995).

As Lipases são enzimas que atuam sobre lipídeos, catalisando alguma reação química que estas moléculas possam sofrer. No veneno de serpente as PLA<sub>2s</sub> são as enzimas mais estudadas devido a sua importância e ampla gama de atividades biológicas (Kini, 2003). São várias as lipases encontradas nos venenos ofídicos, como exemplo poderia ser citado todas as PLA<sub>2</sub> já descritas na literatura.

Os componentes não protéicos também chamados de substâncias simples são ainda divididos em inorgânicos (íons Magnésio, Cálcio, Zinco) e orgânicos (aminoácidos, lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos e aminas biogênicas) com diferentes estruturas e funções sendo, por exemplo, usadas para imobilização e morte da presa (Bjarnason, & Fox, 1994; Tu, 1982).

Componentes de grande importância biológicas incluem neurotoxina, cardiotoxina, lectina, desintegrina, peptídeos natriuréticos e várias enzimas, como fosfolipases, proteases e fosfodiesterases (Matsui et al, 2000).

A família Viperidae, maior responsável pelos acidentes ofídicos (Barraviera, 1990), é representada por três gêneros, *Lachesis* (surucucu), *Crotalus* (cascavéis) e *Bothrops* (jararacas). Esta família tem cerca de 250 espécies distribuídas pelo mundo e é formada por serpentes solenóglifas (Nunes, 1994). Serpentes solenóglifas são aquelas que possuem um único par de presas funcional em cada maxila, este é grande, oco e permanece paralelo ao crânio quando a serpente está em repouso, mas gira 90° no momento de injetar o veneno.

O veneno proveniente da família Viperidae causa efeitos locais, sistêmicos ou ambos. Lesões locais são características deste envenenamento e considera-se que miotoxinas estejam envolvidas no dano muscular e necrose (Gutiérrez e Lomonte, 1989). Alterações na coagulação sanguínea, cardiovasculares, renais, hemorragias localizadas longe do local da picada como, gengivais e uterinas, são resultantes dos efeitos sistêmicos (Kamiguti *et al.*, 1996).

Com relação à América do Sul, o Brasil é o país com maior índice de acidentes com cerca de 20.000 casos/ano, em seguida está o Peru com 4.500 casos, Venezuela com aproximadamente 3.000 casos, Colômbia com 2.675 casos/ano, Equador com 1.200 a 1.400 casos e Argentina com 1.150 a 1.250 casos/ano (Warrel, 2004). O veneno das serpentes da América do Sul, por exemplo, possui componente capaz de interferir na coagulação e na função plaquetária (Gutiérrez e Rucavado et al., 2000).

## 1.2 Acidentes Ofídicos.

Acidentes com serpentes venenosas são bastante comuns e ocorrem em muitas regiões do globo terrestre (Cardoso et al., 1993). Estes acidentes são um problema para a saúde pública, em especial nos países tropicais pela frequência com que ocorrem, pela gravidade e por possíveis seqüelas deixadas nas vítimas (Pinho & Pereira, 2001).

Existem no mundo aproximadamente 3000 espécies de serpentes, das quais de 10% a 14% são consideradas peçonhentas (Cardoso, 1982). A Organização Mundial de Saúde (OMS) calcula que ocorram a nível mundial aproximadamente 2.500.000 acidentes por serpentes peçonhentas por ano, com 125.000 mortes (Chippaux, 1998).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (MS), ocorrem entre 19.000 a 22.000 acidentes ofídicos por ano, com letalidade ao redor de 0,45% (Ministério da Saúde, 2001).

Dos vários tipos de serpentes existentes no Brasil, destacam-se as dos gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus*, sendo o primeiro o de maior interesse no que diz respeito a acidentes ofídicos. As serpentes deste gênero são as responsáveis por 90% dos acidentes no território nacional. A seguir é ilustrado um fluxograma simplificado para a identificação dos principais gêneros de serpentes venenosas (Figura 1).

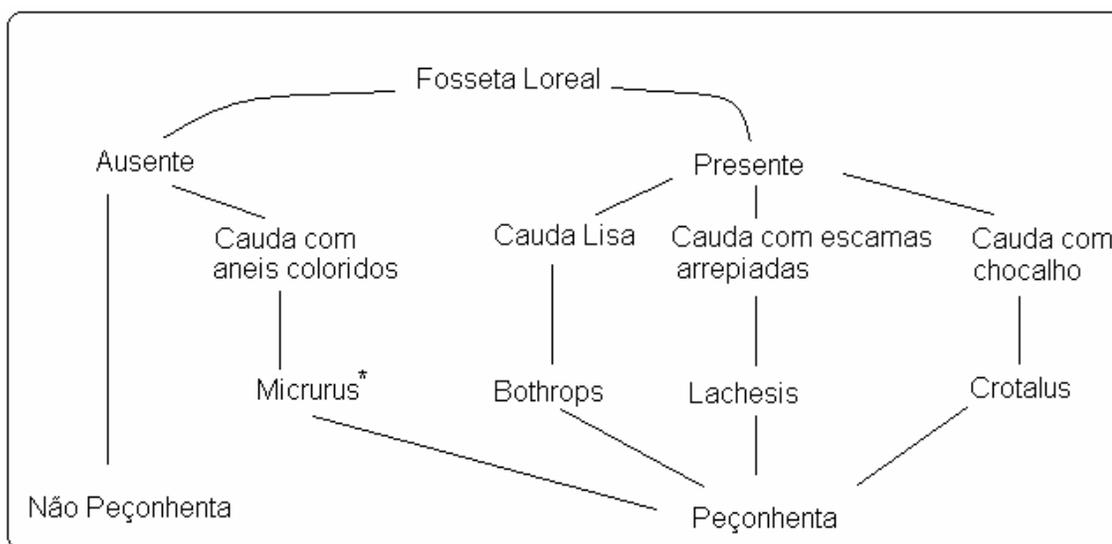


Figura 1: Fluxograma para identificação das serpentes venenosas da fauna Brasileira (Araújo, 2003). \* Na Amazônia ocorrem corais verdadeiros sem anéis vermelhos.

Apesar de causarem diversos acidentes e serem uma preocupação para a saúde pública, as serpentes prestam um importante serviço às populações rurais pois, fazem um controle natural de roedores que deterioram produtos armazenados e são transmissores de doenças aos seres humanos.

Outra importante utilidade das serpentes é no estudo e na possibilidade de utilização como novos fármacos a partir de seu veneno, tornando este uma ferramenta neste campo de pesquisa, exemplos disso são o Captopril, sintetizado com base na estrutura de peptídeos (peptídeos potencializadores de bradicinina) isolados do veneno de *Bothrops jararaca* (Ferreira & Rocha e Silva, 1962; Ferreira, 1965; Harvey et al., 1998) e os estudos sobre uma proteína extraída do veneno de *Crotalus durissus*

*terrificus*, a crotamina, a qual é seiscentas vezes mais potente que a morfina (Cury e Picolo, 2006).

### 1.3 Família Viperidae ou Subfamília Crotalinae:

#### 1.3.1 Gênero *Bothrops*: *Bothrops jararacussu*.

As serpentes *Bothrops jararacussu* são venenosas e muito comuns no Brasil (Bahia e Mato Grosso até o Rio Grande do Sul) em especial na região de Cerrado (Fig. 2) onde se tem plantio de cereais, pois este tipo de cultivo favorece a presença de roedores, que são sua principal alimentação, mas esta serpente pode ser encontrada também na Bolívia, Paraguai e Argentina (Homsí-Brandeburgo et al., 1988).

A *Bothrops jararacussu* possui fosseta loreal (orifício entre as narinas e olhos), cauda lisa e cabeça triangular, sendo esta primeira característica um indicativo de animal peçonhento. Apresenta cores e desenhos diferentes pelo corpo, variando do verde ao negro. A espécie tem dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores que os machos e diferentes na coloração ele cinza e ela amarelada. Possuem hábitos diversos, podendo ser encontradas em regiões de matas, entocadas à beira dos rios ou dentro d'água. Seu tamanho pode variar, na vida adulta, de 40 cm a 2m de comprimento e são muito temidas pela quantidade de veneno que podem injetar.

A sua peçonha apresenta ação hemorrágica (causada por proteases denominados metaloproteases) que provocam lesões na membrana dos capilares, também apresentam ação coagulante (transformando diretamente o fibrinogênio em fibrina) e ação proteolítica (ação citotóxica direta nos tecidos por frações proteolíticas do veneno). As lesões locais de patogênese complexa decorrem da atividade de proteases hialuronidases e fosfolipases, da liberação de mediadores da resposta inflamatória, da ação das hemorraginas no endotélio vascular e da ação pro - coagulante do veneno, bem como efeitos sistêmicos como distúrbios da coagulação sangüínea, hemorragia e insuficiência renal aguda (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Voronov *et al*, 1999).

As manifestações variam de acordo com a quantidade de veneno aplicada porém, as manifestações locais são marcantes e caracterizadas por dor imediata de intensidade variável (Jiménez-Porras, 1973).

O dano tecidual pode ser tão intenso que severas conseqüências, como degeneração vascular e isquemias, podem levar a amputação do membro afetado (Nishioka et al., 1992).

O prognóstico geralmente é bom, embora haja possibilidade de ocorrer seqüelas e a letalidade é baixa nos casos tratados (Silva et al., 2003).

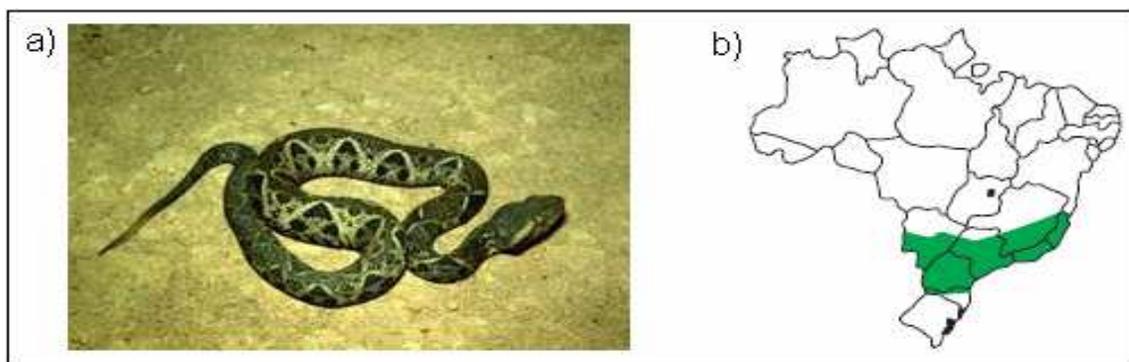


Figura 2: Serpente *Bothrops jararacussu*. b) Mapa do Brasil, mostrando as regiões em que se encontra a serpente estudada. ([www.venomousreptiles.org/libraries/Snakes](http://www.venomousreptiles.org/libraries/Snakes))

### 1.3.2 Gênero *Calloselasma*: *Calloselasma rhodostoma*

A serpente *Calloselasma rhodostoma* é encontrada no sudeste da Ásia, da Tailândia ao norte da Malásia (Fig. 3a) e na Ilha de Java (Tsai et al., 2000 e 2001), esta também é conhecida como *Agkistrodon rhodostoma* ou *Ancistrodon rhodostoma* é de grande significância médica principalmente na Malásia e Tailândia, pois é responsável por uma grande parcela dos acidentes ofídicos nestas localidades, sendo por isso um assunto de interesse para uso em produtos farmacêuticos (Tsai et al., 2001).

A *Calloselasma rhodostoma* pertencente a este grupo possui temperamento agressivo, de ataque rápido quando perturbada. Os casos de mordidas desta serpente são predominantemente rurais e um risco para trabalhadores destas regiões.

Atinge um comprimento de 76 cm em média, com fêmeas que são maiores que machos. Ocasionalmente, eles podem crescer até 91 cm (Mehrtens, 1987).

Este veneno tem sido extensivamente estudado e sua natureza é principalmente hemorrágica (Dambisya e Lee, 1994). Dentre outros componentes o veneno contém, enzimas trombina-like, hemorraginas, indutores de agregação plaquetária, desintegrinas, proteases antiplaquetárias, alfa-fibrinogenase e L-amino oxidase (Daltry et al., 1996).

As serpentes venenosas da Malásia podem ser divididas em 5 subfamílias:

1. Crotalinae: representada por dois gêneros: *Calloselasma* e *Trimeresurus*.

2.Elapinae: representada por 5 gêneros: *Naja*, *Bungarus*, *Ophiophagus*, *Maticora* e *Calliophis*.

3.Laticaudinae: representada pelo gênero *Laticauda*.

4.Hydrophiini: representada por 6 gêneros, *Enhydrina*, *Kerilia*, *Hydrophis*, *Thalassophis*, *Pelamis* e *Kolpophis*.

5.Ephalophiini: representada pelo gênero, *Aipysurus*.

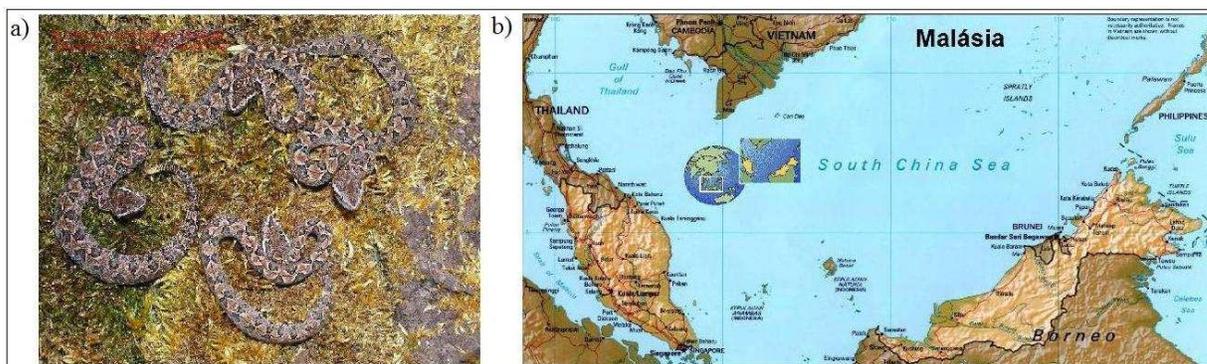


Figura 3a: Serpente *Calloselasma rhodostoma*. b) Mapa mostrando a região sudoeste da Ásia, especificamente a Malásia, região em que se encontra a serpente estudada ([www.giftschlangenkampa.de/crotalidae.htm](http://www.giftschlangenkampa.de/crotalidae.htm)).

### 1.3.3 Fosfolipases $A_2$ .

As fosfolipases podem ser divididas em várias classes de acordo com o seu sítio de hidrólise, no caso das  $PLA_2$  (EC 3.1.1.4) estas catalisam especificamente a hidrólise da ligação acil-éster na posição sn-2 do 1,2-diacilglicerídeo em uma reação dependente de cálcio, liberando ácidos graxo e lisofosfolipídios (Arni e Ward, 1996; Kini 2003).

Os venenos de serpentes são fonte de fosfolipases  $A_2$  ( $PLA_{2s}$ ) e frequentemente de um grande número de izoenzimas, como é o caso do veneno da *Daboia* (anteriormente, *Vipera*) *russelli*, *Protobothrops* (anteriormente, *Trimeresurus*) *flavoviridis*, *Austrelaps superbis* e *Pseudechis australis* que contém mais de dez isoenzimas de  $PLA_2$  (Subburaju e Kini, 1997; Singh et al., 2000).

As  $PLA_2$  secretadas ocorrem em uma ampla variedade de fluidos biológicos, como secreções pancreáticas, exudatos inflamatórios e venenos de serpentes, artrópodes e moluscos (Valentin e Lambeau, 2000). Ainda com relação às secretadas, se têm discutido recentemente as implicações das  $PLA_2$  de mamíferos em processos patofisiológicos como reumatismo, osteoartrite, psoríase, choque séptico, asma e insuficiência respiratória em adultos (Kudo e Murakami, 2002).

Atualmente as PLA<sub>2</sub> tem sido classificadas em onze grupos de acordo com a estrutura primária e o número e posição das pontes dissulfeto (Six e Dennis, 2000), ou seja, uma reavaliação muito mais detalhada de uma classificação anterior, feita pelo mesmo autor (Dennis, 1994).

Anteriormente as PLA<sub>2</sub> eram organizadas em quatro grandes classes denominadas de I – IV, sendo as três primeiras: classe I (PLA<sub>2</sub> provenientes de pâncreas de mamíferos e venenos Elapídeos), classe II (PLA<sub>2</sub> provenientes de venenos Viperídeos), classe III (PLA<sub>2</sub> provenientes de venenos de abelhas e lagartos) classificadas como enzimas extracelulares (secretadas), de baixo peso molecular (~12 a 15 kDa) e com alto conteúdo de pontes dissulfeto (~5 a 7) e a PLA<sub>2</sub> pertencente à classe IV classificada como enzimas intracelulares, de alto peso molecular e substrato específico o ácido araquidônico (Dennis, 1994).

As PLA<sub>2</sub> da classe II têm sido subdivididas em Asp49 (D49) e Lys49 (K49) (Gutiérrez e Lomonte, 1995).

As PLA<sub>2</sub> Asp49 são enzimas com atividade catalítica, onde o oxigênio do grupo carboxila contribui para a ligação do cofator Ca<sup>+2</sup> essencial na fixação do fosfato e estabilização da carga negativa do oxigênio do grupo carbonil da ligação éster na posição sn-2 do substrato (van den Bergh et al., 1988). Estas são PLA<sub>2</sub> típicas, pois hidrolisam substratos sintéticos na posição sn-2 e preferencialmente agem sobre substratos em estado micelar (Verheij et al., 1981; Holzer e Mackessey, 1996). Por exemplo, as isoformas de PLA<sub>2</sub> 6-1 e 6-2 (Ponce-Soto et al., 2006) presentes na fração BthTX-II do veneno de *Bothrops jararacussu* e também a PLA<sub>2</sub> de origem crotálica, tais como F6 e a isoforma F6a de *Crotalus durissus collilineatus* (Ponce-Soto., 2002, 2007b respectivamente), as isoformas Cdr-12 e Cdr-13 de *Crotalus durissus ruruima* (Ponce-Soto, et al., 2007c) todas estas, mostraram-se cataliticamente ativa em substrato cromogênico sintético 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzóico.

### 1.3.4 Miotoxinas “like” PLA<sub>2</sub>.

Espécie	Nome Toxina	Código SwissProt	Referência
<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	AppK49	P04361	Maraganore et al (1984) e Maraganore e Heinnikson (1986)
<i>Agkistrodon bilineatu</i>	PLA <sub>2</sub> -II	_b	Nikai et al (1994)
<i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	ACL miotoxina	P49121	Johnson e Ownby (1993) e de Araújo et al (1996 a)
Selistre			
<i>Atropoides (Bothrops) nummifer</i>	Miotoxina I	_b	Gutiérrez et al (1986 a)
<i>Atropoides (Bothrops) nummifer</i>	Miotoxina Ih	_b	Rojas et al (2001)
<i>Atropoides (Bothrops) nummife</i>	Miotoxina II	P82950	Angulo et al (2000, 2002)
<i>Bothrops alternatus</i>	BaTX	_b	Ponce-Soto et al (2007)
<i>Bothrops asper</i>	Miotoxina II	P24605	Lomote e Gutiérrez (1989) e et al (1991)
Francis			
<i>Bothrops asper</i>	Miotoxina IV	_b	Díaz et al (1995)
<i>Bothrops asper</i>	Miotoxina Iva	_c	Lizano et al (2001)
<i>Bothrops atrox</i>	Ba-K49	_b	Maraganore et al (1984)
<i>Bothrops atrox</i>	BaPLA <sub>2</sub> -I	_b	Kanashiro et al (2002)
<i>Bothrops atrox</i>	Miotoxina I	_b	Nuñez et al (2004)
<i>Bothrops jararacussu</i>	Bothropstoxina I	Q90249	Homs-Brandeburgo et al (1988) Cintra et al (1993)
<i>Bothrops jararacussu</i>	Bothropstoxina II	AO27454	Cintra et al (1993)
<i>Bothrops moojeni</i> et al	Miotoxina I	P82114	Lomonte et al (1990b) e Soares (2000 a)
<i>Bothrops moojeni</i> et al	Miotoxina II	Q91834	Lomonte et al (1990b) e Soares 1998)
<i>Bothrops Neuwied</i>	Miotoxina I	b	Georghegan et al (1999)
<i>Bothrops Neuwied pauloensis</i>	BnSP-7	Q9IAT9	Rodrigues et al (1998) e Soares et al (2000b)
<i>Bothrops piraja</i>	Piratoxina I	P58399	Toyama et al (1995, 1998)
<i>Bothrops pirajai</i>	Piratoxina II	P82287	Toyama et al (1995, 2000)
<i>Bothrops pradoi</i>	PRA-1	_b	Moura-daSilva et al (1991a)
<i>Bothriechis (Bothrops) schlegelli</i>	Miotoxina I	P80963	Angulo et al (1997) e Tsai et al (2001)
<i>Calloselasma rhodostoma</i>	CRV-K49	Q9PVF3	Tsai et al (2001)
<i>Cerrophidion (Bothrops) godmani</i>	Miotoxina II	P81165	Díaz et al (1992) e de Sousa et al (1998)
<i>Cerrophidion (Bothrops) godmani</i>	PgoK49	Q8UVU7	Tsai et al (2001)
<i>Crotalus atrox</i>	Cax-K49	Q8UVZ7	Tsai et al (2001)
<i>Crotalus molossus molossus</i>	Cmm-K49	_b	Tsai et al (2001)
<i>Deinagkistrodon (Agkistrodon) acutus</i>	Dac-K49	O57385	Wang et al (1996) e Fan et al (1999)
<i>Deinagkistrodon (Agkistrodon) acutus</i>	Dac-K49b	_c	Tsai et al (2001)
<i>Trimeresurus albolabris</i>	Tal-K49	_b	Tsai et al (2001)
<i>Trimeresurus flavoridis</i>	BP-I	P20381	Yoshizumi et al (1990)
<i>Trimeresurus flavoridis</i>	BP-II	E48188	Liu et al (1990)
<i>Trimeresurus gramineus</i>	PLA <sub>2</sub> -V	P70090	Nakai et al (1995)
<i>Trimeresurus gramineu</i>	PLA <sub>2</sub> -VII	P70089	Nakashima et al (1995)
<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	TMV-K49	P22640	Wang et al (1996) e Liu et al (1991)
<i>Trimeresurus okinavensis</i>	To3	Q92152	Nobuhisa et al (1996)
<i>Trimeresurus puniceus</i>	Tpu-K49	_b	Tsai et al (2001)

Tabela 1: Os nomes em parêntesis indicam designações anteriores. Os \_b indicam seqüências de aminoácidos parciais ou ainda sem código no banco de dados Swiss Prot.

A primeira PLA<sub>2</sub> Lys49 foi descoberta em uma serpente crotálica norte americana *Agkistrodon p. piscivorus* (Maraganone et al., 1984). As PLA<sub>2</sub> Lys49 são proteínas homólogas, ou seja, com estrutura molecular similar as PLA<sub>2</sub> Asp49 que perderam a atividade enzimática devido à substituição, principalmente, do aminoácido aspartato (Asp) pela lisina (Lys) na posição 49 da cadeia polipeptídica (Gutiérrez e Lomonte, 1995). Estas substituições afetam a habilidade destas proteínas se ligarem ao cálcio, sendo este um cofator de grande importância na estabilização da estrutura tetraédrica que forma o sítio ativo, deixando-o preparado para que o substrato se acople e haja a catálise (Arni e Ward, 1996).

Até o presente momento têm sido isoladas várias PLA<sub>2</sub> homólogas K49 a partir de serpentes da família viperidae como mostra a Tabela 1.

Estas proteínas, desprovidas ou com atividade enzimática residual, desencadeiam suas atividades biológicas a partir de outros mecanismos independentes da liberação do ácido araquidônico (Selistre de Araújo et al., 1996), independentes de cálcio e mecanismos não hidrolíticos (Díaz et al., 1991). Apesar da perda da atividade catalítica, as PLA<sub>2</sub> K49 demonstram atividade de dano de membrana via uma independência de Ca<sup>+2</sup> e mecanismos não hidrolíticos (Díaz et al., 1991). Assim, as Lys49 desencadeiam também atividades/efeitos farmacológicos como o citolítico em cultura de mioblastos e miotubos (Bonfim, et al 2006; Ponce-Soto., et al., 2007a), edema (Landucci et al, 2000), miotoxicidade local (Gutiérrez e Lomonte, 1989), porém não miotoxicidade sistêmica, como foi evidenciado no caso da BaTX isolada de *Bothrops alternatus* recentemente descrita (Ponce-Soto, et al., 2007a), atividade bactericida (Páramo et al., 1998) dentre outros.

Pólgar et al (1996) descreveram pelo menos mais duas variantes com um resíduo de serina ocupando a posição 49, denominada PLA<sub>2</sub> Ser49.

Estas enzimas em geral são tóxicas, ao contrário das encontradas em mamíferos, e induzem um amplo espectro de efeitos farmacológicos apesar de haver similaridade na sua estrutura primária, secundária e terciária além de propriedades catalíticas comuns (Kini, 1997). As PLA<sub>2</sub> de mamíferos desempenham importante papel, por exemplo, na proliferação celular (Anita et al., 1991), doenças inflamatórias crônicas (Vadas e Pruzanski, 1986) e em processos celulares como transdução de sinal via biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos (Verheij et al., 1981), não são tóxicas e são impotentes na indução de efeitos farmacológicos potentes.

As PLA<sub>2</sub> de venenos em adição as suas funções de digestão de presas, em geral roedores, exibem variedade de efeitos farmacológicos dentre eles estão neurotoxicidade, carditoxicidade, miotoxicidade, atividades hemolíticas, convulsivas, anticoagulantes, antiplaquetárias, indução de edema e efeitos de danos de tecidos.

Acredita-se (Kini e Chan, 1999; Kordis e Gubensek, 1997) que esta variedade de efeitos farmacológicos se deva a um processo microevolutivo acelerado através do qual houve varias substituições de aminoácidos em regiões localizadas principalmente na superfície destas moléculas.

Os venenos vipérideos contêm PLA<sub>2</sub> com habilidade para causar rápida necrose das fibras musculares esqueléticas, sendo assim referidas como PLA<sub>2</sub> miotóxicas (Gutierrez, et al., *in press*).

Similaridades na estrutura das PLA<sub>2</sub> e diversidade na sua função fazem a relação estrutura-função e o mecanismo de ação algo intrigante, desafiante para os cientistas. Por tal motivo, as PLA<sub>2s</sub> provenientes de venenos de serpentes tem sido amplamente empregadas como ferramentas farmacológicas usadas para investigar suas funções em diversos processos patofisiológicos (Kini, 2003), na tentativa de se desenvolver estratégias que solucionem estes complexos e intrigantes processos.

## **OBJETIVOS.**

## 2. Objetivos:

### 2.1. Gerais:

Caracterizar as PLA<sub>2</sub> e PLA<sub>2</sub> homólogas K49, tanto bioquímica quanto biologicamente para melhor detalhá-las e conhecê-las buscando assim entender a relação estrutura-função.

### 2.2. Específicos:

**2.2.1)** Isolamento de novas PLA<sub>2</sub> e PLA<sub>2</sub> K49 homólogas provenientes do veneno de *Calloselasma rhodostoma* através de cromatografia de alta eficiência (HPLC).

**2.2.2)** Caracterização físico-química das PLA<sub>2</sub> (6-1, 6-2 e Cr-IV 1) e PLA<sub>2</sub> K49 homólogas (Bj-VII e Cr 5) a partir de:

2.2.2.1) Eletroforese SDS-Page.

2.2.2.2) Espectrometria de massa em Maldi-Tof (MS).

2.2.2.3) Atividade PLA<sub>2</sub>.

2.2.2.4) Análise de Aminoácidos.

2.2.2.5) Homologia Seqüencial (Estrutura Primária).

**2.2.3)** Caracterização biológica das PLA<sub>2</sub> (6-1, 6-2 e Cr-IV 1) e PLA<sub>2</sub> K49 homólogas (Bj-VII e Cr 5) através do estudo das atividades:

2.2.3.1) Citotóxica em modelos de células da musculatura esquelética (C2C12) e fibroblastos (3T3 e COS7).

2.2.3.2) Miotóxica a partir da determinação dos níveis de CK plasmático *in vivo*.

2.2.3.3) Inflamatória a partir da avaliação do aumento de volume da pata inoculada em comparação com a pata controle.

2.2.3.4) Atividade letal via intracerebroventricular.

**2.4)** Análise Comparativa dos aspectos estruturais e funcionais das PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 e das PLA<sub>2</sub> homólogas K49 Bj-VII e Cr 5, procedente de *Bothrops jararacussu* e *Calloselasma rhodostoma*, respectivamente.

### **3. Material e Métodos.**

#### **3.1 Animais:**

Para os ensaios biológicos são utilizados camundongos machos Swiss (18 a 20g), obtidos no biotério central da Unicamp e com autorização da Comissão de Ética para a Experimentação Animal (Protocolo n°\_1207-1).

#### **3.2 Venenos e Reagentes:**

O veneno de *Bothrops jararacussu* foi adquirido da Bio-Agents Serpentário Proteínas Bioativas Ltda (Fazenda Boa Esperança, Batatais) e de *Calloselasma rhodostoma* é proveniente do zoológico de répteis de Kentucky (U.S.A.). Todos os reagentes e produtos químicos utilizados foram de grau HPLC, com alto grau de pureza, obtidos do Sigma Aldrich Chemicals, Merck e Bio Rad.

#### **3.3 Purificação do veneno de *Calloselasma rhodostoma* e obtenção da PLA<sub>2</sub> D49 denominada Cr-IV 1 em coluna de exclusão molecular Protein Pack SW300.**

O veneno bruto de *Calloselasma rhodostoma* (20mg) foi homogeneizado em tampão bicarbonato de amônio 0,25M, pH 7,9 e centrifugado a 1000 rpm por 2 minutos para a clarificação da solução. O sobrenadante foi aplicado a uma coluna Protein Pack SW300 (0.78 cm x 30 cm) e eluído com bicarbonato de amônio 0,25M, pH 7,9 a um fluxo de 0,3ml/min. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm usando-se um detector UV/visível modelo 490 e as frações coletadas em um coletor automático de frações modelo Foxy 200, liofilizada e armazenada a - 20°C. A fração denominada Cr-IV (com atividade PLA<sub>2</sub>) além de coletada, liofilizada e armazenada seguiu no processo de purificação.

##### **3.3.1 HLPC de Fase Reversa para obtenção da PLA<sub>2</sub> D49 Cr-IV 1 e da PLA<sub>2</sub> K49 homóloga Cr 5.**

Esta metodologia foi aplicada para a purificação da fração Cr-IV 1 que apresentou atividade PLA<sub>2</sub> e foi obtida anteriormente por exclusão molecular e, para a purificação do veneno total de *Calloselasma rhodostoma* e obtenção da PLA<sub>2</sub> K49

homóloga, Cr 5. Esta metodologia foi realizada como descrito por Ponce-Soto et al (2006).

Assim, cerca de 5 mg da fração Cr-IV 1 e do veneno bruto (para a obtenção da PLA<sub>2</sub> K49) foi dissolvida em 250 ml de ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) (solvente A). A solução resultante foi submetida à centrifugação para clarificação e o sobrenadante aplicado a uma coluna  $\mu$ -Bondapack C-18 preparativa (0.78 cm x 30 cm; Waters 991-PDA). As proteínas foram eluídas em um gradiente linear (0-100%) com 66.5% (v/v) de acetonitrila em 0.1% (v/v) ácido trifluoroacético (solvente B) a um fluxo de 2,0 ml/min. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm e as frações coletadas, liofilizadas e armazenadas a -20°C. As proteínas purificadas, obtidas nesta etapa foram denominadas como Cr-IV 1 e Cr 5.

### **3.4 Caracterização físico-química da PLA<sub>2</sub> D49 denominada Cr-IV 1 e da PLA<sub>2</sub> K49 homóloga Cr 5.**

#### **3.4.1 Eletroforese em PAGE-SDS.**

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com Laemmli (1970) e realizada em um sistema High Small II 250 (Hoefer Scientific). As amostras (Cr-IV 1 e Cr 5) e marcadores foram dissolvidas em tampão de amostra Tris-HCl 0,075 M, pH 6,8, 10% de Glicerol, 4% de SDS, 0,001% de Bromofenol. As massas moleculares dos marcadores em kDa foram: fosfolipase B – 94, albumina – 67, ovalbumina – 43, carbônica anidrase – 30, inibidor de tripsina de soja – 20 e lisozima – 14. A corrida foi realizada usando-se uma amperagem constante de 40 mA durante 60 minutos e ao final desta, os géis foram corados com Coomassie Blue 0,05% a 37°C.

#### **3.4.2 Espectrometria de Massa por Maldi-TOF (MS)**

A massa molecular da PLA<sub>2</sub> D49 Cr-IV 1 e Cr 5 foram analisadas por espectrometria de Massa utilizando-se um Voyager DE PRO MALDI-TOF espectrômetro de massa (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A amostra (1 $\mu$ l) dissolvida em TFA 0,1% foi misturada a 2 $\mu$ l de da matriz (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid). A matriz foi preparada com  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinnamic ácido (Sigma), 30% de acetonitrila e 0,1% (v/v) TFA. A massa foi analisada de acordo com os

seguintes parâmetros: aceleração de voltagem 25 kV, laser ajustado a 2890 mJ/cm<sup>2</sup>, em 300 ns, modo de análise linear (Smolka et al, 2001).

### **3.4.3 Determinação da Atividade PLA<sub>2</sub>.**

A atividade fosfolipásica foi realizada segundo o método de Cho e Kézdy (1991) e Holzer e Mackessy (1996) modificado para placas de 96 poços por Ponce-Soto et al (2002). A mistura para o ensaio continha 200 µl de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0), 20 µl de substrato (4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid), 20 µl de água e 20 µl de PLA<sub>2</sub> formando um volume final de 260 µl. Após a adição de 20 µg das PLA<sub>2s</sub> em teste, a mistura foi incubada por 40 minutos a 37<sup>0</sup>C e a absorbância lida em intervalos de 10 minutos. A atividade da enzima, expressa como a velocidade inicial de reação (V<sub>0</sub>), foi calculada baseada no aumento da absorbância após 20 min de reação e utilizado o fator de calibração para a transformação em velocidade de reação. O ensaio foi realizado em triplicata e a reação lida em absorbância de 425 nm em um leitor de placas SpectraMax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### **3.4.4 Análise de Aminoácidos.**

A análise de aminoácidos foi realizada em um analisador automático de aminoácidos Pico-Tag (Waters) como descrito por Henrikson e Meredith (1984). A proteína purificada (30 µg) foi hidrolisada a 105 °C por 24 horas em 6M de HCl (Pierce sequencing grade) contendo 1% de fenol (w/v). O hidrolisado reagiu com 20µl de solução de derivatização (ethanol: triethylamine:water:phenylisothiocyanate, 7:1:1:1, v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. Os PTC aminoácidos foram identificados em um analisador automático de PTH aminoácidos modelo 120 A (Applied Biosystem) de acordo com o tempo de retenção e as áreas dos picos dos 20 PTH aminoácidos padrão.

### **3.4.5 Determinação da seqüência primária.**

#### **3.4.5.1 Redução e Carboximetilação.**

As toxinas em estudo (PLA<sub>2</sub> Cr-IV 1 e da PLA<sub>2</sub> homóloga Cr 5) foram repurificadas em HPLC de Fase Reversa usando-se coluna µ-Bondapack analítica (Waters PDA 991). As toxinas puras foram dissolvidas em 6M de guanidina/HCl, 0,4M de Tris pH 8,15, 2 mM EDTA, reduzidas com dithiothreitol (DTT) e carboximetiladas

com C14 ácido iodo acético (Marangoni et al., 1995). A dessalinização das amostras foi realizada em coluna G-25, previamente equilibrada com ácido acético glacial 1M.

#### **3.4.5.2 Digestão enzimática e purificação dos fragmentos peptídicos.**

As toxinas CR-IV 1 e Cr 5 foram liofilizadas, reduzidas e carboximetiladas foram inicialmente digeridas com duas enzimas. Primeiro com a protease V8 de *Staphilococcus aureus* por 16 horas a 37<sup>0</sup>C, com uma razão enzima-substrato de 1:30. Sendo a reação interrompida e a amostra liofilizada logo em seguida de acordo com o método descrito por Houmard e Drapean (1972). Depois com a Clostripaina por 8 horas, a 37<sup>0</sup>C, segundo processo descrito por Cintra et al (1993). Após a interrupção da reação as amostras são liofilizadas.

Estas toxinas digeridas com protease V8 e Clostripaina foram repurificadas em HPLC de Fase Reversa (Waters PDA 991) e a separação dos peptídeos foi feita com um gradiente de acetonitrila em 0,1% de ácido trifluoroacético.

#### **3.4.5.3 Seqüência N-terminal.**

A seqüência de aminoácidos foi obtida pelo seqüenciamento da região N-terminal da proteína reduzida e carboximetilada e o seqüenciamento completo através dos peptídeos obtidos por hidrólise enzimática.

Tanto o seqüenciamento automático da região N-terminal, como dos peptídeos, foram feitos em um seqüenciador automático modelo Procise 991 da Applied Biosystem. Os PTH aminoácidos foram identificados por comparação com o tempo de retenção dos 20 PTH aminoácidos padrão. Os peptídeos contendo Cys foram identificados como PTH carboximetil cisteína marcada e confirmada por contagem radioativa (Beckman model L- 8 250). A estrutura primária das Cr-IV 1 e da PLA<sub>2</sub> homóloga Cr 5 foi principalmente construída baseando-se nos peptídeos purificados provenientes das proteínas digeridas com protease SV8 e clostripain (Ponce-Soto et al, 2006).

### **3.5 Caracterização biológica das PLA<sub>2</sub> D49 denominadas: 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 e das PLA<sub>2</sub> homólogas: Bj-VII e Cr 5.**

#### **3.5.1 Atividade Citotóxica (C2C12).**

A atividade citotóxica foi realizada em células que representam o músculo esquelético, linhagem C2C12 como descrito por Lomonte et al (1999a). Quantidades variadas de toxinas foram diluídas em meio de cultura DME (Dulbecco's Modified Eagle's) suplementado com 1% de soro fetal bovino e adicionado a placas de 96 poços (150 µl por poço). Os controles de 0 e 100% de toxicidade consistem respectivamente no meio de ensaio e 0,1% de Triton X-100. Depois de 3 horas a 37<sup>0</sup>C, alíquotas do sobrenadante foram coletadas para a quantificação da enzima lactato desidrogenase liberada (LDH; EC 1.1.1.27) proveniente das células lisadas por ação das toxinas em estudo, usando-se para isso ensaios colorimétricos (Kit LDH-P UV Método UV otimizado SFBC Lab. Winer) e leitura a 340 nm. Todos os experimentos foram feitos em triplicatas.

#### **3.5.1.1 Atividade Citotóxica (3T3 e COS7).**

A atividade citotóxica foi também realizada em células de fibroblastos (linhagens 3T3 e COS7) como previamente descrita por (Lomonte et al., 1994 e 1999). Em todos os ensaios, as células foram contadas e colocadas em placas de 96 poços na concentração de 5x10<sup>4</sup> células por poço, durante 24 horas antes de se iniciar o tratamento. Assim, as células foram tratadas com diferentes concentrações de fosfolipases (PLA<sub>2</sub> D49: 6-1, 6-2 e PLA<sub>2</sub> K49: Bj-VII de *Bothrops jararacussu*) durante 24 horas, a 37<sup>0</sup>C em 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. Cada concentração foi testada em 3 diferentes experimentos, sendo cada experimento feito em triplicata. As toxinas foram diluídas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's) suplementado com 1% de soro fetal bovino e adicionado a placas de 96 poços (150 µl por poço). Depois de 3 horas a 37<sup>0</sup>C, alíquotas do sobrenadante foram coletadas para a quantificação da enzima lactato desidrogenase liberada (LDH; EC 1.1.1.27) proveniente das células lisadas por ação das toxinas em estudo, usando-se para isso ensaios colorimétricos (Sigma N°500) e leitura a 340 nm. Todos os experimentos foram feitos em triplicatas.

### **3.5.2 Atividade Miotóxica.**

Para a determinação da atividade miotóxica local e sistêmica produzidas a partir da exposição às PLA<sub>2</sub> D49 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 e PLA<sub>2</sub> homólogas K49 Bj-VII e Cr 5, foi organizado um grupo de 4 camundongos (18-20 g) que recebeu injeção intramuscular (i.m) e outro grupo que recebeu injeção intravenosa (i.v), no gastrocnêmico. Foram utilizadas quantidades variadas de toxinas dissolvidas em 50 µl de tampão PBS, sendo que um grupo controle recebeu 50 µl de PBS.

Em intervalos de tempo, sangue foi coletado da cauda em capilares heparinizados e o plasma removido para medida dos níveis de CK plasmático (CK; EC 2.7.3.2), sendo esta atividade medida através de ensaio cinético utilizando o Kit CK-Nac (Sigma 47-UV), assim, a 1ml do substrato preparado são acrescentados 10 µl do plasma obtido por centrifugação do sangrado da região caudal do camundongo. Incubou-se por 2 minutos e foram lidos os aumentos da absorbância a 430 nm, posteriormente se multiplica pelo fator 4130. A atividade foi expressa em U/l, definida como a fosforilação de 1 mmol de creatina/min a 25 °C.

### **3.5.3 Determinação da Atividade Inflamatória.**

Para a determinação da atividade inflamatória ocasionada por ação das toxinas em estudo, grupos de 4 camundongos (18-20g) receberam injeções subcutâneas (s.c) na pata direita das PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 e das PLA<sub>2</sub> homólogas Bj-VII e Cr 5.

Foi utilizada solução-mãe inicial de 400 µg/ml de PBS (20 µg/50µl), depois foram feitas diluições, tomando-se 500 µl da primeira e misturando-se com 500 µl de PBS (10 µg/50 µl), a partir disso foram feitas diluições seriadas até se alcançar à concentração de 2,5 µg/50µl.

A pata esquerda recebeu 50 µl de PBS, como controle. Foram feitas leituras em intervalos de tempo de 30 minutos, 1 hora, 3, 6 e 24 horas após a injeção das toxinas. A determinação do edema produzido foi calculada baseando-se no aumento (em mm) da pata inoculada em comparação com a outra que recebeu solução de PBS e a dose mínima de formação do edema foi definida como a dose de toxina que induziu 30% de edema.

### **3.5.4 Determinação da Dose Letal Via Intracerebroventricular.**

Diferentes doses das toxinas: PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 e das PLA<sub>2</sub> homólogas: Bj-VII e Cr 5, dissolvidas em 10 ml de PBS, foram injetadas pela rota intracerebroventricular (i.c.v), em grupos de 4 camundongos (18-20 g), anestesiados com éter usando-se microseringas Hamilton (Gutiérrez et al., 1986). Um grupo controle recebeu injeção de PBS e a sobrevivência dos animais foi avaliada 24 horas após, sendo utilizado o método de Probits para o cálculo da DL50 (World Health Organization, 1981). Este teste é realizado para sabermos a dose hábil para matar 50% de uma população em estudo e assim termos uma idéia de qual é a melhor dose para a realização dos testes biológicos.

### **3.6 Análise Estatística.**

Os resultados foram reportados como a média  $\pm$  erro padrão. A significância foi obtida através do teste de Dunnett's quando vários grupos experimentais foram comparados com um grupo controle. O limite de confiança foi de  $p \leq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS:

### 4.1 Purificação e Caracterização físico-química da fração Cr-IV 1 a partir do veneno total de *Calloselasma rhodostoma*.

A pureza de uma amostra pode ser indicada com ótima confiabilidade através do uso de cromatografia em coluna quando usado sistema de HPLC, que dispõem de detectores muito sensíveis que determinam a absorvidade do eluído da coluna em todo espectro de luz visível e ultravioleta (Chromatography Columns-Waters).

Para a purificação do veneno da *Calloselasma rhodostoma* foi utilizada uma coluna Protein Pack SW 300 e, o perfil cromatográfico mostra sete frações denominadas como Cr-I a Cr-VII (Figura 1). A eluição do veneno foi feita com 0,25M de bicarbonato de amônio, pH 7,9 a um fluxo de 0,3 ml/min sendo o perfil cromatográfico monitorado a 280 nm. Nas frações Cr-III e Cr-IV foram identificadas atividade fosfolipásica. Frações contendo atividade PLA<sub>2</sub> (Cr III e Cr IV) foram coletadas, liofilizadas e estocadas a -20°C.

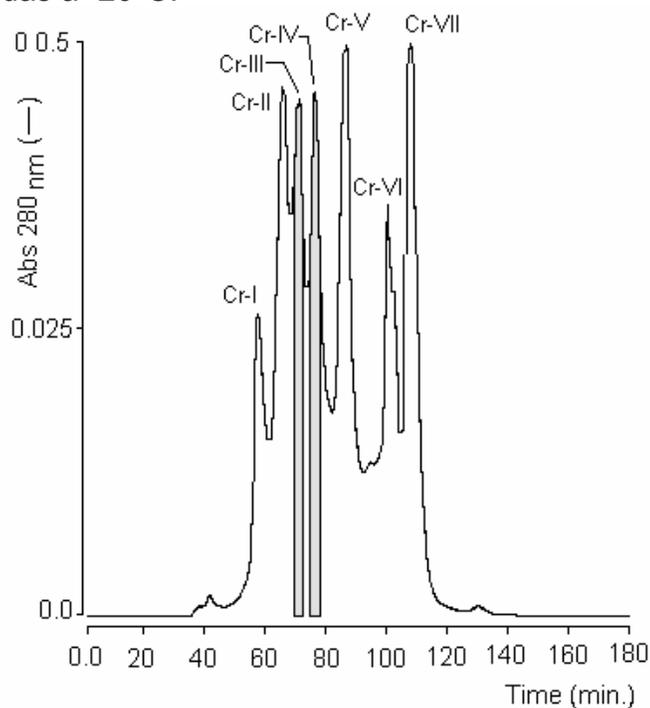


Figura 1: Cromatografia de exclusão molecular do veneno de *Calloselasma rhodostoma* em coluna Protein-Pack 300 SW (0.78 cm x 30 cm). A eluição do veneno foi feita com 0,25M de bicarbonato de amônio, pH 7,9 a um fluxo de 0,3 ml/min. A eluição do perfil foi monitorada a 280 nm e as principais frações são denominadas como CrI-CrVII.

A recromatografia da fração Cr-III através da coluna de fase reversa em HPLC evidenciou três picos denominados de Cr-III 1, Cr-III 2 e Cr-III 3 (dados não mostrados), os quais foram identificados como (CRV-H1E6), (CRV-S1E6a) e (CRV-S1E6b), respectivamente (Tsai et al., 2000).

A fração Cr-IV 1, previamente obtida em uma coluna de exclusão molecular, foi recromatografada em coluna de fase reversa sendo obtidas duas frações denominadas Cr-IV 1 (aqui estudada) e Cr-IV 2 (CRV-K49) (Tsai et al., 2000). Como mostra a Figura 2, a primeira é alvo deste estudo por não ter sido ainda descrita na literatura e sendo esta a responsável pela atividade fosfolipásica.

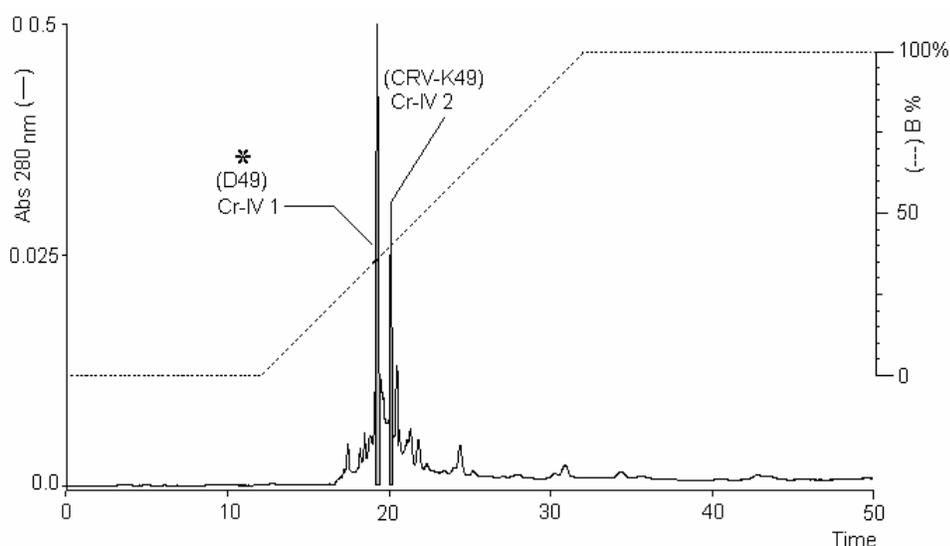


Figura 2: Re-cromatografia da fração Cr-IV, proveniente do veneno de *Calloselasma rhodostoma*. 5 mg da Cr-IV foram dissolvidos em 250  $\mu$ l de 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético, centrifugados e o sobrenadante aplicado a uma coluna de fase reversa  $\mu$ -Bondapack C 18 (0.78 cm x 30 cm) Waters 991-PDA, a um fluxo de 2 ml/min. A eluição foi monitorada a A280 nm e as frações Cr-IV 1 (D49) (estudada neste trabalho) e Cr-IV 2 (CRV-K49) obtidas.

A figura 3 mostra que a CR-IV 1 apresenta uma única banda com massa molecular de 14kDa e em condições não reduzidas esta apresenta o dobro da massa (30 kDa). A partir da técnica de espectrometria de massa o grau de pureza da fração Cr-IV 1 foi confirmado e a proteína analisada apresenta massa molecular de 14.029 Da. O ponto isoelétrico (pI) foi teoricamente determinado com base na dedução da seqüência de aminoácido e apresenta valor de 8,55.

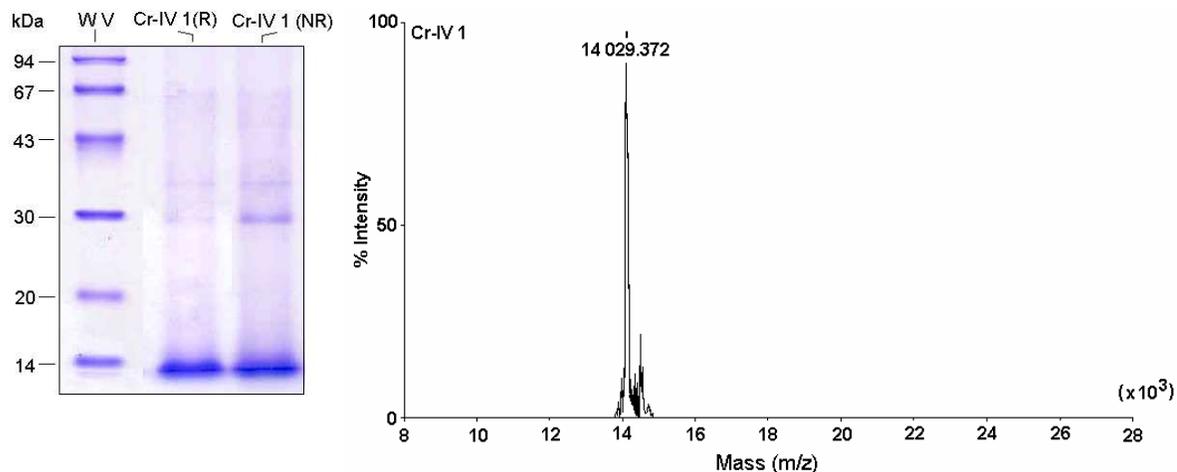


Figura 3: Perfil da fração Cr-IV 1 em gel de Tricina SDS-PAGE em condições não reduzidas (NR) e reduzidas (R) (Marcadores de massa molecular ( $\times 10^{-3}$ )). A massa molecular da Cr-IV 1 foi determinada por espectrometria de massa em MALDI-TOF.

O teste de atividade fosfolipásica é um acompanhamento necessário das etapas de cromatografia, pois, esta atividade catalítica é uma característica marcante da proteína. A atividade fosfolipásica (PLA<sub>2</sub>) da Cr-IV 1 (25  $\mu\text{g/ml}$ ), foi evidenciada usando um substrato cromogênico sintético 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzóico (Holzer e Mackessy, 1996) modificado por (Ponce-Soto, 2002). Esta proteína purificada apresenta atividade catalítica maior que o veneno bruto de *Calloselasma rhodostoma* (Cr Total), sua procedência. Os valores de atividade fosfolipásica foram: Cr Total  $7,43 \pm 0,23$  nmol/mg/min, Cr-III foi  $0,89 \pm 0,13$  nmol/mg/min, Cr-IV  $9,98 \pm 0,39$  nmol/mg/min e Cr-IV 1  $14,25 \pm 0,36$  nmol/mg/min.

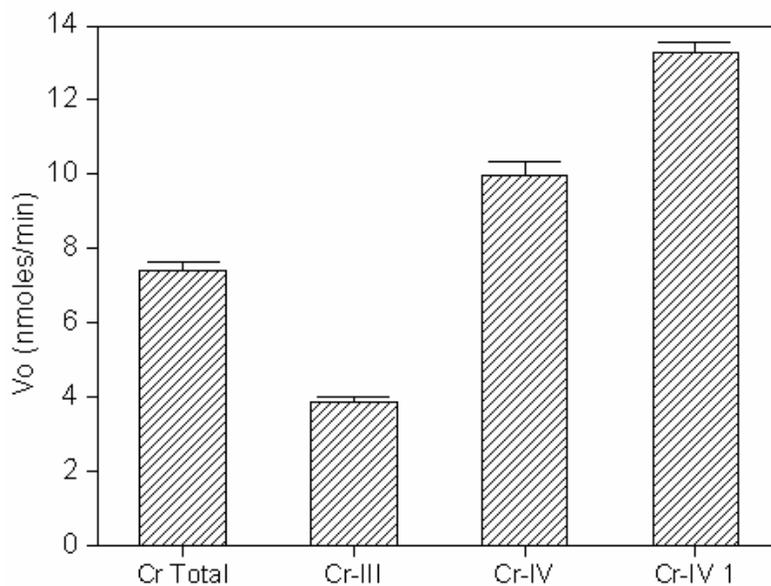


Figura 4: Atividade PLA<sub>2</sub> da *Calloselasma rhodostoma*: veneno total (25  $\mu\text{g/ml}$ ), Cr-III (25  $\mu\text{g/ml}$ ), Cr-IV (25  $\mu\text{g/ml}$ ) e Cr-IV 1 (25  $\mu\text{g/ml}$ ).

O produto obtido por digestão da Cr-IV 1 com clostripaina foi cromatografado em HPLC de fase reversa e evidenciou a presença de 16 peptídios, já o produto obtido com a digestão de protease SV8 resultou em 9 peptídeos (dados não mostrados). Assim, a estrutura primária da Cr-IV 1 foi determinada por sobreposição das seqüências obtidas. Apesar de vários peptídeos terem sido purificados e seqüenciados somente CIt-3, CIt-7, CIt-9, SV8-2, SV8-4 e SV8-6 foram importantes para a determinação da estrutura primária da Cr-IV 1 (dado não mostrado).

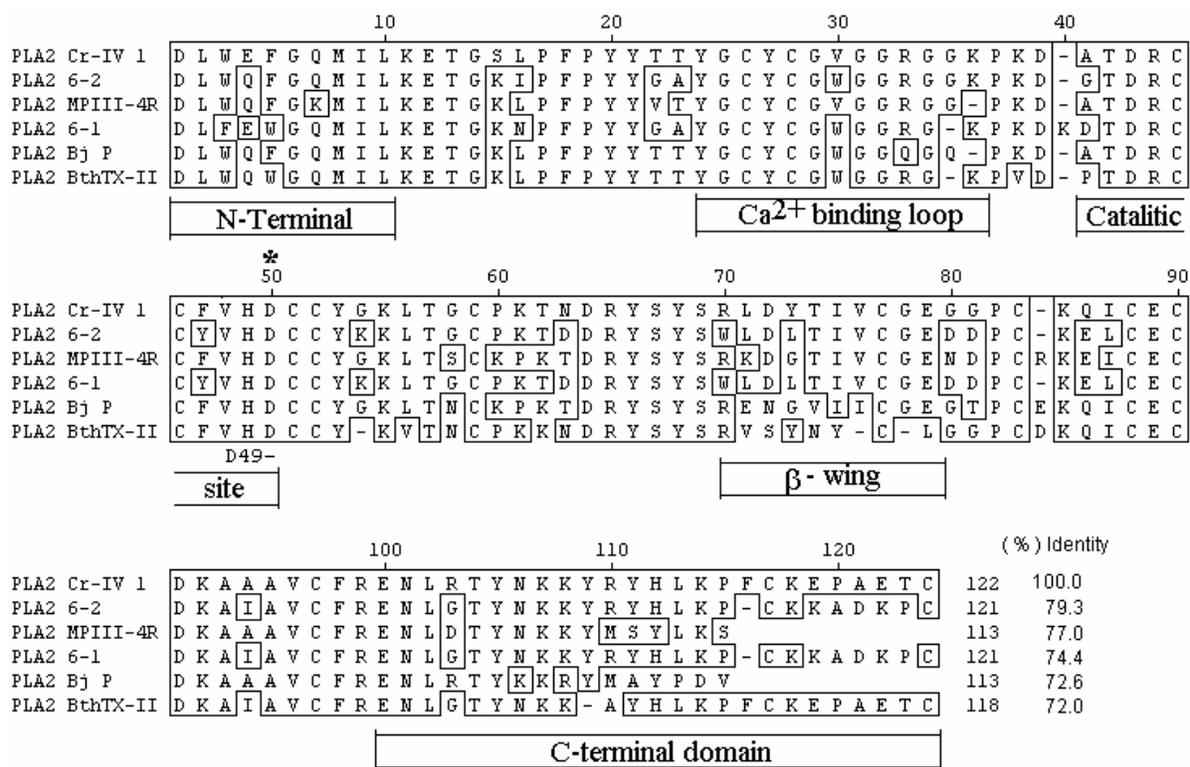


Figura 5: Alinhamento da seqüência de aminoácidos da Cr-IV 1 com seqüências de outras PLA<sub>2</sub> obtidas de banco de dados de proteínas BLAST (PubMed-Medline). 6-2 PLA<sub>2</sub> D49 provenientes de *Bothrops jararacussu*, (Ponce-Soto et al., 2006), PLA<sub>2</sub> MPIII-4R provenientes de *Bothrops pirajai* (Toyama et al, 1999), 6-1 PLA<sub>2</sub> D49 provenientes de *Bothrops jararacussu* (Ponce-Soto et al., 2006), PLA<sub>2</sub>Bj p provenientes de *Bothrops jararacussu*, (Moura-da-Silva, 1995), BthTx-II – bothropstoxin II provenientes de *Bothrops jararacussu* (Pereira et al., 1998).

#### 4.2 Caracterização Biológica das PLA<sub>2</sub> D49 6-1 e 6-2 proveniente do veneno de *Bothrops jararacussu* e Cr-IV1 proveniente do veneno de *Calloselasma rhodostoma*.

O efeito miotóxico *in vivo* das PLA<sub>2</sub> D49 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 foi estudado em grupos de camundongos machos (Swiss 18-20g). As proteínas foram injetadas no músculo gastrocnêmico direito para a indução de miotoxicidade local e também de maneira intravenosa (i.v) para a indução da miotoxicidade sistêmica. 20 µg das proteínas em 50 µl de PBS foram inoculados e grupos controles foram feitos com 50 µl de PBS.

A atividade da creatina quinase (CK) foi determinada usando 5 µl de plasma que foram incubados por 3 min a 37°C com 1,0 ml de reagente de acordo com o protocolo CK-UV proveniente do Sigma Chemical Co. A atividade foi expressa em unidades por litro (U/l), definida como a fosforilação de 1µmol de creatina por minuto a 37°C.

As PLA<sub>2</sub> D49 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 induziram miotoxicidade local mas não sistêmica, evidenciada pela rápida e dose-dependente elevação da atividade CK plasmática que teve alcance máximo às 2 horas de tratamento, retornando ao normal após 24 horas (Figura 6).

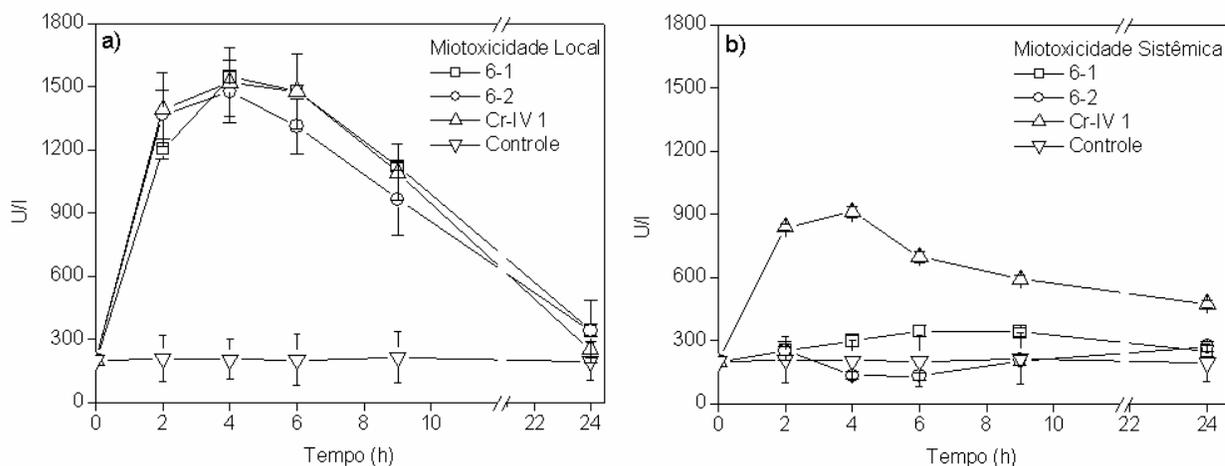


Figura: 6a) Miotoxicidade local e b) Miotoxicidade Sistêmica das PLA<sub>2</sub> D49 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 em grupos de camundongos machos Swiss (18-20g). A atividade de creatina Kinase (CK) foi determinada usando 5 µl de plasma incubado por 3 minutos a 37°C com 1,0 ml de reagente (kit CK-UV) proveniente do Sigma Chemical Co.

A citotoxicidade (citólise) das PLA<sub>2</sub> D49 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 foram estimadas através da liberação de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura após 3 horas de exposição à proteína. O efeito das miotoxinas foi estudado em cultura de mioblastos e miotubos, células esqueléticas musculares (linhagem C2C12) assim como em fibroblastos (linhagens 3T3 e COS7).

A PLA<sub>2</sub> D49 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 rapidamente lisaram as células da musculatura esquelética (C2C12) com uma dosagem de 40 µg/poço (40 µg/150 µl), a 6-1 causou 83,06% de citotoxicidade em mioblastos e 93,78% em miotubos, já a 6-2 75,12 % e 86,26% de citotoxicidade e a Cr-IV 1, 91,50% e 88,40% de citotoxicidade em mioblastos e miotubos respectivamente (Figura 7). Destas três, a Cr-IV 1 foi à única que se mostrou levemente mais ativa em mioblastos enquanto, as outras duas foram mais ativas em miotubos. Todas as proteínas estudadas mostraram um efeito citotóxico registrado pelo aumento do nível de LDH à medida que as doses da fração foram sendo acrescentadas.

A linhagem de fibroblastos 3T3 foi exposta às mesmas PLA<sub>2</sub> D49 previamente mencionadas para se investigar também o efeito citotóxico a partir da quantificação do dano celular (liberação de LDH) (Figura 8a). Na concentração de 5 µM as PLA<sub>2</sub> D49 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 causaram 85.63%, 85% e 91,34% de citotoxicidade respectivamente (Figura 7a). Na mesma dosagem, porém na linhagem de fibroblasto (COS7) as PLA<sub>2</sub> D49 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 mostraram atividade um pouco mais intensa na lise das células em estudo (95.42%, 95.07% e 96.42% respectivamente) induzindo significativa liberação de LDH após 3 horas de exposição das células a proteínas.

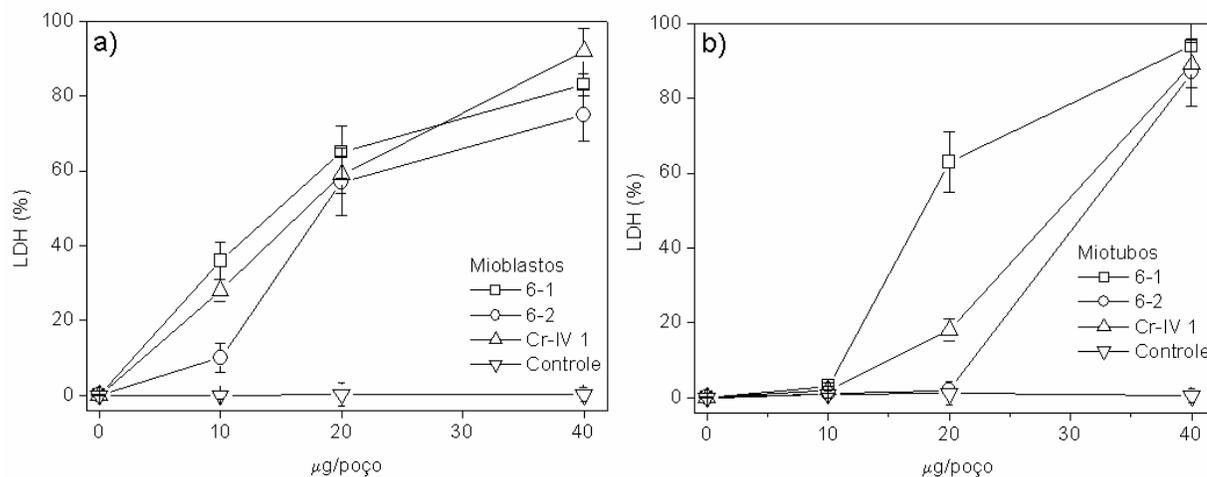


Figura 7a): A citotoxicidade das PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 em mioblastos e 7b) Citotoxicidade das PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 em miotubos da musculatura esquelética (C2C12) foi medida a partir da liberação de LDH. O controle para 0 e 100% de toxicidade consiste de meio de ensaio e de 0.1% de Triton X-100, respectivamente. Cada ponto representa a média ± desvio padrão (SD) em experimentos realizados em triplicata.

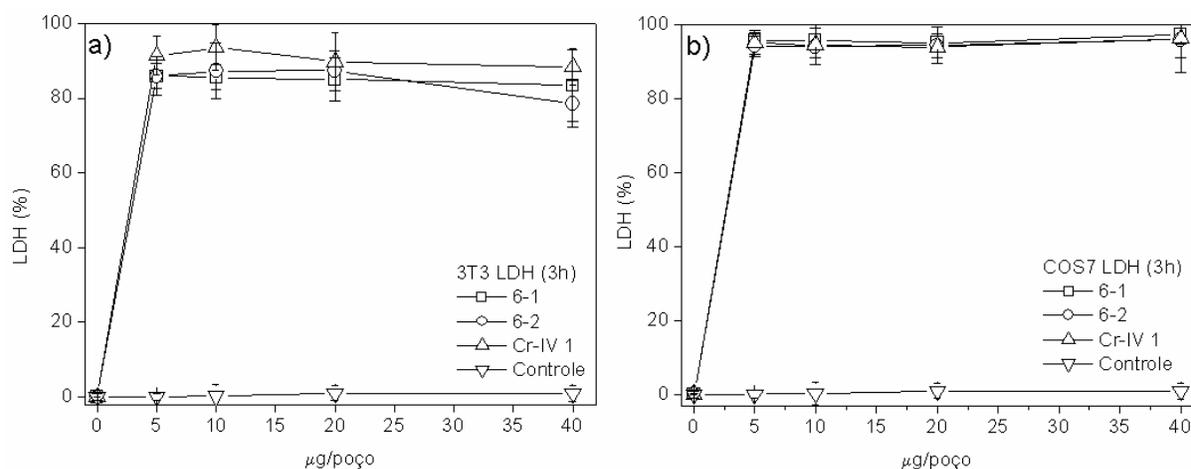


Figura: 8a) A citotoxicidade das PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 em fibroblastos (linhagem 3T3) e 8b) Citotoxicidade na linhagem COS7 foi medida a partir da liberação de LDH no meio de ensaio. O controle para 0 e 100% de toxicidade consiste de meio de ensaio e de 0.1% de Triton X-100, respectivamente. Cada ponto representa a média ± desvio padrão (SD) em experimentos realizados em triplicata.

Para o estudo da atividade inflamatória das PLA<sub>2</sub> D49 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 foi verificado um dos eventos que ocorre neste complexo processo, a formação de edema, para isso estas proteínas foram dissolvidas em 50ul de PBS (5µg proteína/50 µl PBS) e aplicadas sob a região intraplantar da pata direita em grupos de quatro camundongos (18-20g). A pata esquerda recebeu 50 µl de tampão (PBS) como controle. Os animais foram sacrificados com o uso de inalação por CO<sub>2</sub> depois de 0.5, 2, 3, 6 e 24 horas e ambas as patas cortadas e pesadas (Yamakawa, 1976).

O edema foi expresso como o percentual de aumento de peso da pata direita com relação à pata esquerda (controle). Assim, as toxinas estudadas induziram moderado edema 2 horas após o tratamento, evidenciando um aumento local na permeabilidade vascular (Figura 9).

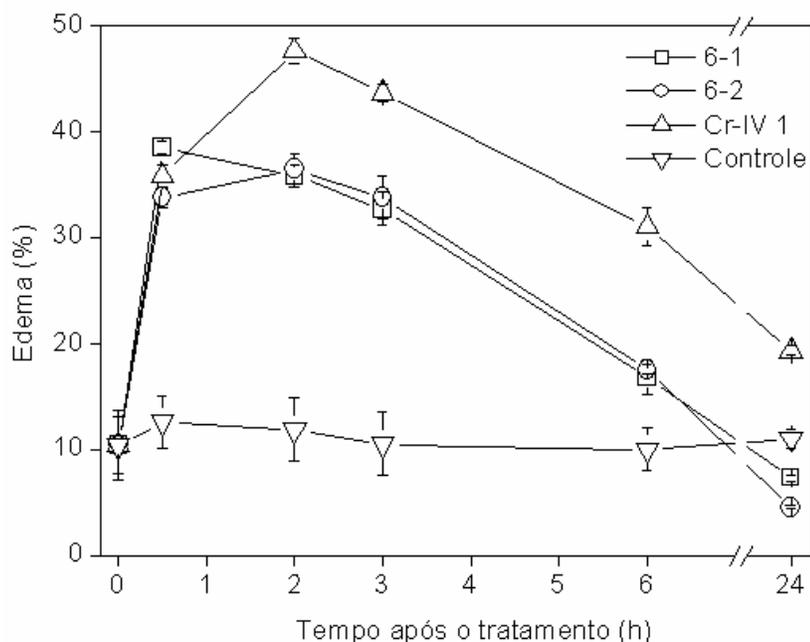


Figura 9: Atividade inflamatória das PLA<sub>2</sub> D49 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 de *Calloselasma rhodostoma*. Grupos de 4 camundongos (18-20g) foram injetados na região subplantar com 5 µg/50 µl de PBS na pata esquerda e a direita recebeu 50 µl de PBS como controle. Cada ponto representa a média ± desvio-padrão (SD) de um grupo com 4 animais.

### 4.3 Purificação caracterização físico-química da PLA<sub>2</sub> K49 Cr 5 proveniente do veneno de *Calloselasma rhodostoma*.

Do veneno total de *Calloselasma rhodostoma* foram pesados 5mg e dissolvidos em 250 µl de 0,1% (v/v) ácido trifluoroacético (solvente A). A solução resultante foi dissolvida e centrifugada, sendo o sobrenadante aplicado a uma coluna µ-Bondapack C-18 (0.78 cm x 30 cm; Waters 991-PDA).

As proteínas foram eluídas com um gradiente linear (0-100%) de 66.5% (v/v) de acetonitrila em 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (solvente B), a um fluxo de 2.0 ml/min. O perfil de eluição foi monitorado a 280nm e as frações foram coletadas, liofilizadas e estocadas a – 20<sup>o</sup>C.

As principais frações obtidas foram CRV-K49 (Tsai, 2000), CRV-H1E6, CRV-S1E6A, CRV-S1E6B (Tsai, 2001) usadas como referências e Cr 5, uma nova PLA<sub>2</sub>, alvo deste estudo por não ter sido ainda descrita na literatura.

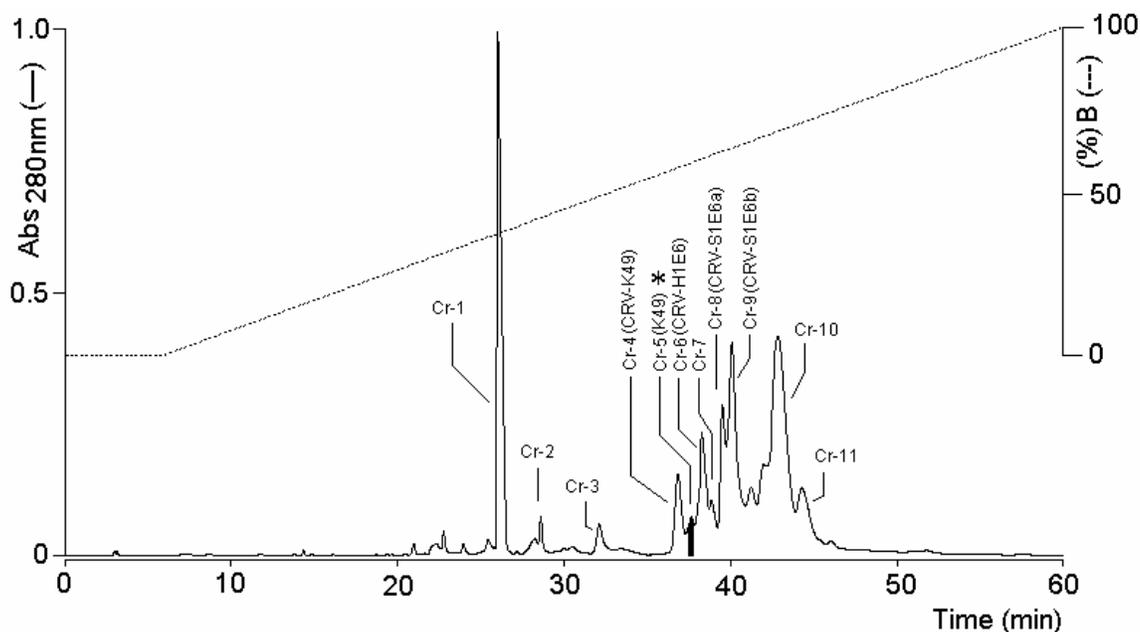


Figura 10: Cromatografia de Fase Reversa em coluna µ-Bondapack C 18 (0,78 cm x 30 cm; Waters 991-PDA Waters) acoplada a um sistema de HPLC do veneno de *Calloselasma rhodostoma*. A eluição do perfil cromatográfico foi monitorada a 280 nm. As principais frações obtidas foram: CRV-K49 (Tsai, 2000), CRV-H1E6, CRV-S1E6A, CRV-S1E6B (Tsai, 2001) usadas como referências e Cr 5, a nova PLA<sub>2</sub>.

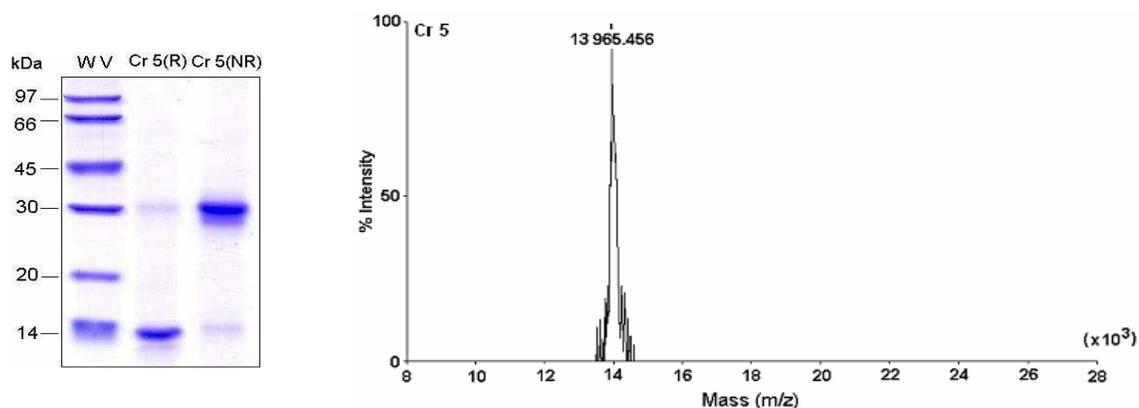


Figura 11: Perfil da fração Cr 5 em gel de Tricina SDS-PAGE em condições reduzidas (R) e não reduzidas (NR) (Marcadores de massa molecular:  $\times 10^{-3}$ ). A massa molecular da Cr 5 foi determinada por espectrometria de massa em MALDI-TOF.

Esta nova PLA<sub>2</sub> proveniente do veneno de *Calloselasma rhodostoma* mostrou no perfil eletroforético massa de 15 kDa em condições reduzidas e 30 kDa em condições não reduzidas (Figura 11) e 13.955.456 Da, como mostra a análise de espectrometria de massa em MALDI-TOF, sendo a partir desta técnica confirmado seu grau de pureza (Figura 11).

A análise de aminoácidos mostra a seguinte composição: Asp/Asn 7, Glu/Gln 5, Ser 4, Gly 13, His 2, Arg 5, Thr 14, Ala 6, Pro 11, Tyr 14, Val 4, Met 1, Cys 14 (determinado após hidrólise com 3N ácido mercaptoetanol), Ile 3, Leu 11, Phe 3 e Lys 12 mostrando que esta proteína é uma PLA<sub>2</sub> básica. A Cr 5 revelou conter um alto conteúdo de Lys (19) e também resíduos de aminoácidos hidrofóbicos ou não polares assim como 14 resíduos cisteínas, sugerindo a ocorrência de sete pontes dissulfeto.

Um critério importante para se evidenciar a pureza de uma amostra é a análise da região N-terminal assim, esta seqüência foi obtida pela seqüência direta da Cr 5 reduzida e carboximetilada (RC-Cr 5) em um seqüenciador automático, sendo encontrados 11 resíduos de aminoácidos (Figura 12). A estrutura primária da Cr 5 foi obtida a partir do seqüenciamento dos peptídeos obtido depois do tratamento da RC-Cr 5 com protease SV8 e tripsina. A estrutura primária da PLA<sub>2</sub> K49 homóloga Cr 5 foi construída baseando-se principalmente nos peptídeos purificados: SV8 3, SV8 7 e SV8 4 (provenientes do tratamento enzimático da RC-Cr 5 com protease SV8) e Trp 2, Trp 6, Trp 9, Trp 12, Trp 5, Trp 9 (provenientes do tratamento enzimático da RC-Cr 5 com

Tripsina), sendo sua estrutura determinada por comparação da seqüência overlapping dos peptídeos purificados de ambas digestões.

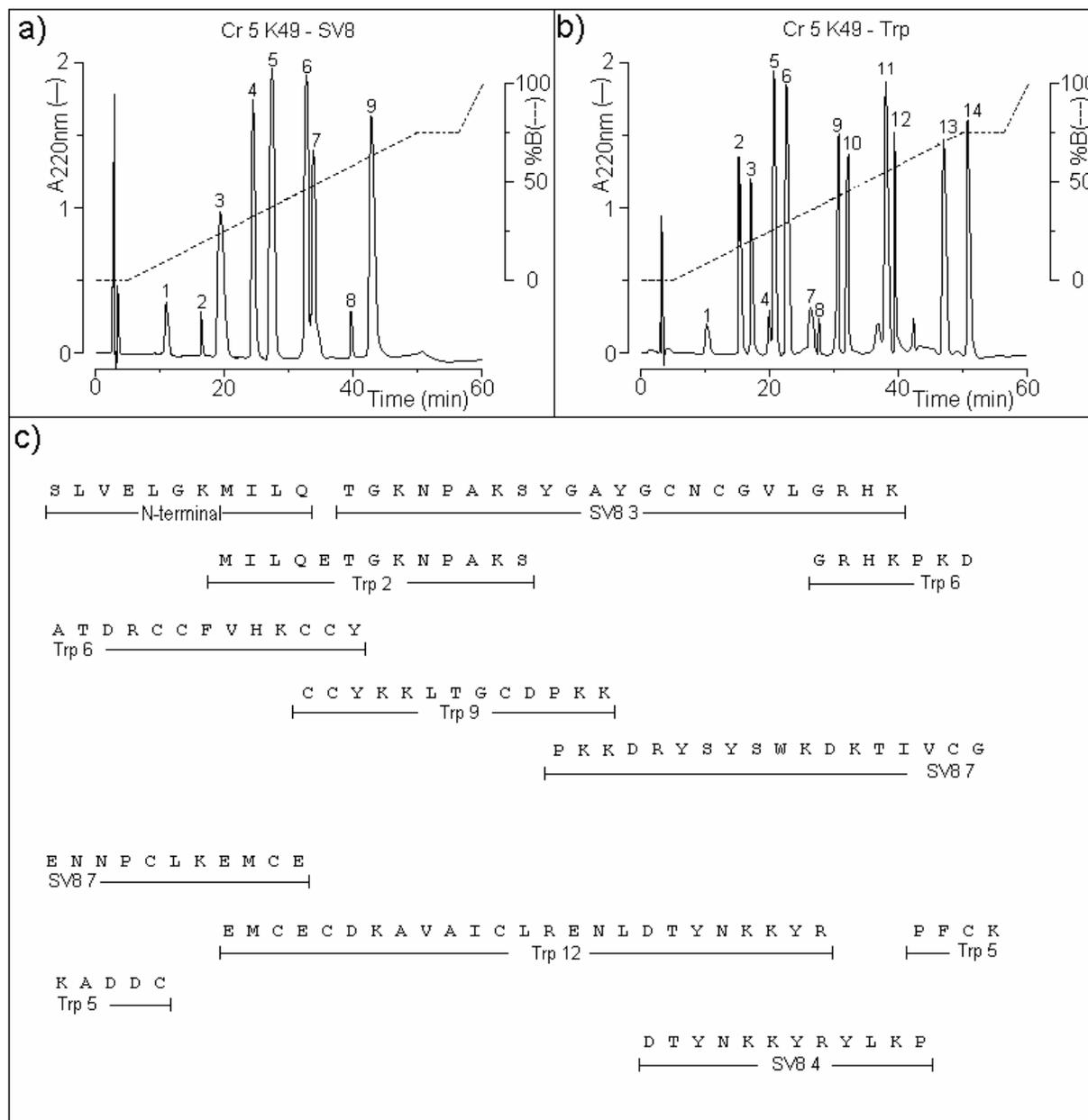


Figura 12a-b: Eluição dos peptídeos produzidos por digestão da RC-Cr 5 com tripsina (Trp) e protease V8 (SV8). No HPLC de fase reversa foi usado a coluna u-Bondapak C18 column (0.39 cm x 30 cm) e um gradiente de acetonitrila descontínuo a um fluxo de 1.0 ml/min. Em c, completa seqüência de aminoácidos da Cr 5 PLA<sub>2</sub> baseado nos peptídeos obtidos pela digestão anterior, nove peptídeos foram importantes: SV8 3, SV8 7, SV8 4, Trp2, Trp6, Trp9, Trp12, Trp5 e Trp9.

A proteína Cr 5 contém 120 resíduos de aminoácidos e mostra um alto grau de homologia com outras PLA<sub>2</sub> K49 homólogas, apesar desta similaridade decair para 94.2% quando comparada com outras PLA<sub>2</sub> homólogas de outras espécies de serpentes (Figura 13).

A proteína purificada Cr 5 não apresentou atividade enzimática detectável em substrato cromogênico sintético 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzóico (Holzer e Mackessey, 1996; Ponce-Soto et al, 2002) (dado não mostrado).

	10	20	30	40	
Cr-5	S L V E L G K M I L Q E T G K N P A K S Y G A Y G C N C G V L G R	H K P K D A T D R			
P82287	S L F E L G K M I L Q E T G K N P A K S Y G A Y G C N C G V L G R	G K P K D A T D R			
Q90249	S L F E L G K M I L Q E T G K N P A K S H G A Y G C N C G V L G R	G K P K D A T D R			
Q9I834	S L F E L G K M I L Q E T G K N P A K S Y G V Y G C N C G V G G R	G K P K D A T D R			
P58399	S L F E L G K M I L Q E T G K N P A K S Y G A Y G C N C G V L G R	G K P K D A T D R			
P24605	S L F E L G K M I L Q E T G K N P A K S Y G A Y G C N C G V L G R	G K P K D A T D R			
Q9IAT9	- - F E L G K M I L Q E T G K N P A K S Y G A Y G C N C G V L G R	G Q P K D A T D R			
P82114	S L V E L G K M I L Q E T G K N P A K S Y G A Y G C N C G V L G R	G K P K D A T D R			
P81165	S M Y Q L W K M I L Q E T G K N A V P S Y G L Y G C N C G V G S R	G K P K D A T D R			
P82950	N L Y Q L W K M I L Q E T G K N A A P S Y G F Y G C N C G V G S R	G K P K D A T D R			
P04361	S V L E L G K M I L Q E T G K N A I T S Y G S Y G C N C G W G H R	G Q P K D A T D R			

	* 50	60	70	80	
Cr-5	C C F V H K C C Y K K L T G C D P K K D R Y S Y S W K D K T I V C G E N N P C L K E				
P82287	C C Y V H K C C Y K K L T G C N P K K D R Y S Y S W K D K T I V C G E N N P C L K E				
Q90249	C C Y V H K C C Y K K L T G C D P K K D R Y S Y S W K D K T I V C G E N N P C L K E				
Q9I834	C C Y V H K C C Y K K L T G C D P K K D R Y S Y S W K D K T I V C G E N N S C L K E				
P58399	C C Y V H K C C Y K K L T G C N P K K D R Y S Y S W K D K T I V C G E N N P C L K E				
P24605	C C Y V H K C C Y K K L T G C N P K K D R Y S Y S W K D K T I V C G E N N S C L K E				
Q9IAT9	C C Y V H K C C Y K K L T G C D P K K D R Y S Y S W K D K T I V C G E N N P C L X E				
P82114	C C Y V H K C C Y K K L T N C D P K K D R Y S Y D W K N K T I V C G E N P C L K Q				
P81165	C C F V H K C C Y K K L T D C S P K T D S Y S Y S W K D K T I V C G D N N P C L Q E				
P82950	C C F V H K C C Y K A L T D C S P K T D S Y S Y S W K D K T I V C G K N N P C L K Q				
P04361	C C F V H K C C Y K K L T D C N H K T D R Y S Y S W K N K A I I C E E K N P C L K E				

(K-49)

	90	100	110	120	(%) Identity
Cr-5	M C E C D K A V A I C L R E N L D T Y N K K Y R Y	- -	L K P F C K K A D D C	120	100.0
P82287	L C E C D K A V A I C L R E N L G T Y N K K Y R Y	- H	L K P F C K K A D D C	121	94.2
Q90249	L C E C D K A V A I C L R E N L G T Y N K K Y R Y	- H	L K P F C K K A D A C	121	93.3
Q9I834	L C E C D K A V A I C L R E N L D T Y N K K Y R Y	N Y	L K P F C K K A D P C	122	93.3
P58399	L C E C D K A V A I C L R E N L G T Y N K L Y R Y	- H	L K P F C K K A D D C	121	93.3
P24605	L C E C D K A V A I C L R E N L N T Y N K K Y R Y	- Y	L K P L C K K A D A C	121	92.5
Q9IAT9	L C E C D K A V A I C L R E N L G T Y N K K Y R Y	- H	L K P F C K K A D P C	119	91.6
P82114	L C E C D K A V A I C L R E N K G T Y N K K - R D V Y	L	K P F C D K G R D C	121	87.5
P81165	M C E C D K A V A I C L R E N L D T Y N K N Y K I	- Y	P K P L C K K A D A C	121	81.7
P82950	E C E C D K A V A I C L R D N L D T Y N K N Y K I	- Y	P K P L C K K A D D C	121	80.8
P04361	M C E C D K A V A I C L R E N L D T Y N K K Y K A	- Y	F K L K C K K P D T C	121	78.3

Figura 13: Seqüência de aminoácido da Cr 5 com outras PLA<sub>2</sub> K49 homólogas obtidas do Blast, banco de dados de proteínas (PubMed–Medline).

#### 4.4 Caracterização Biológica das PLA<sub>2</sub> K49 Bj-VII proveniente do veneno de *Bothrops jararacussu* e Cr 5 proveniente do veneno de *Calloselasma rhodostoma* respectivamente.

Para o estudo da atividade miotóxica foram utilizados os mesmos procedimentos anteriormente mencionados e, a toxina Bj-VII e Cr 5 aplicadas a grupos de 4 camundongos. Depois de 2, 4, 6, 9 e 24 h, o sangue destes animais foi coletado da cauda em tubos capilares heparinizados e centrifugado, sendo o sobrenadante coletado para análise.

*In vivo*, as PLA<sub>2</sub> K49 homólogas, Bj-VII e Cr 5, induziram visível efeito miotóxico local (*i.m*) mas, não sistêmico (*i.v*) evidenciado pela rápida elevação da atividade CK plasmática ao longo do tempo (time course). Esta atividade alcança o seu máximo 2 horas após a injeção e retorna ao seu normal 24 horas depois do tratamento (Figura 14).

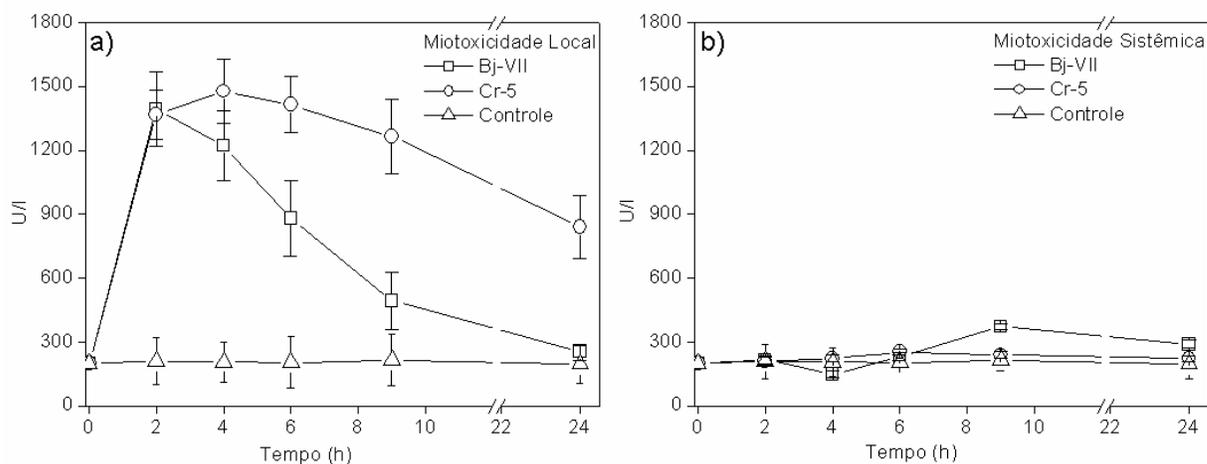


Figura 14a): Miotoxicidade local e 14b) Miotoxicidade Sistêmica das PLA<sub>2</sub> K49 homólogas, Bj-VII e Cr 5, em grupos de camundongos machos Swiss (18-20g). A atividade de creatina Kinase (CK) foi determinada usando 5  $\mu$ l de plasma incubado por 3 minutos a 37<sup>0</sup>C com 1.0 ml de reagente (kit CK-UV proveniente da Sigma Chemical Co).

O efeito citotóxico foi realizado em cultura de mioblastos e miotubos seguindo o descrito no capítulo anterior e, as PLA<sub>2</sub> K49 homólogas, Bj-VII e Cr 5, mostraram-se citotóxicas pois, à medida que a dose da fração aumentava no teste, crescia também o nível de LDH liberados (Figura 15).

*In vitro*, as Bj-VII e Cr 5 rapidamente lisaram a musculatura esquelética em mioblastos e miotubos com uma dose de 40  $\mu$ g/poço (40  $\mu$ g/150 ml), causando 87 $\pm$ 50

de lise em mioblastos e  $84 \pm 85$  em miotubos frente à Bj-VII e  $91 \pm 25\%$  de lise em mioblastos e  $91 \pm 0.8\%$  em miotubos quando em contato com a Cr 5.

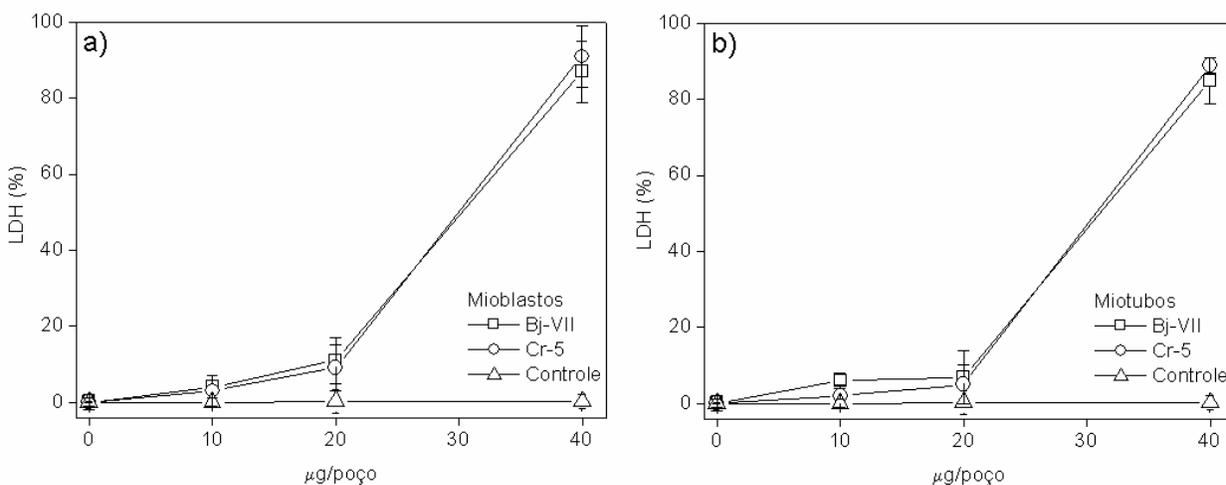


Figura 15a: A citotoxicidade das PLA<sub>2</sub> Bj-VII e Cr 5 em mioblastos e 15b: Citotoxicidade das PLA<sub>2</sub> Bj-VII e Cr 5 em miotubos da musculatura esquelética (C2C12) foram medida a partir da liberação de LDH. O controle para 0 e 100% de toxicidade consiste de meio de ensaio e de 0.1% de Triton X-100, respectivamente. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão (SD) em experimentos realizados em triplicata.

A atividade inflamatória da Bj-VII e Cr 5 proveniente do veneno de *Bothrops jararacussu* e *Calloselasma rhodostoma* foi estudada seguindo os mesmos procedimentos anteriormente realizados com as PLA<sub>2</sub> D49. O edema foi expresso como o percentual de aumento de peso da pata direita com relação à pata esquerda (controle). Assim, a Figura 16 mostra a ação edematizante após 2 horas de exposição às toxinas em estudo, evidenciando um comportamento típico deste tipo de toxina. O efeito em estudo diminui após 24 horas, até alcançar níveis basais.

Todos os efeitos biológicos induzidos pelas toxinas Bj-VII e Cr 5 ocorreram na ausência de atividade fosfolipásica mensurável *in vitro*, suportando a idéia proposta pela literatura (Lomonte et al., 2003; Kini, 2003; Gutiérrez e Ownby, 2003) de mecanismos catalíticos independentes exercidos pelas proteínas Lys49.

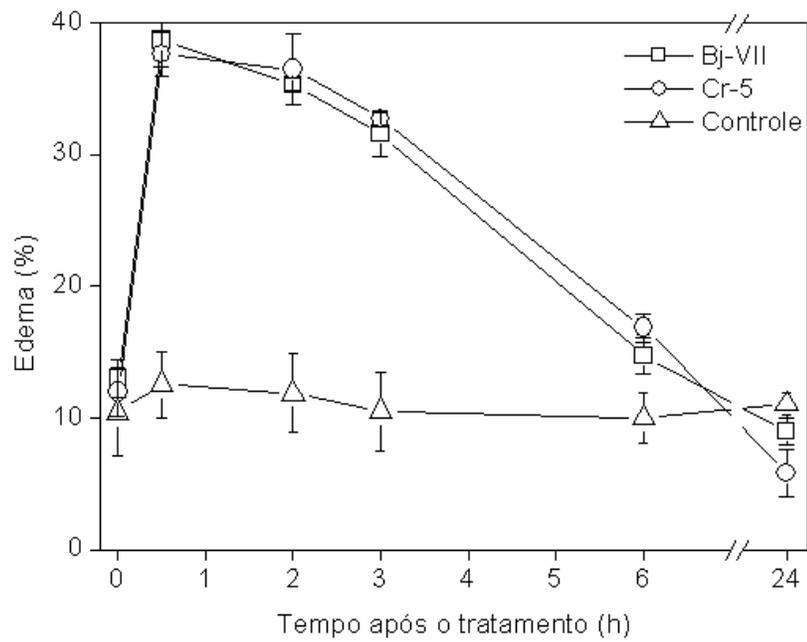


Figura 16: Atividade inflamatória das PLA<sub>2</sub> K49 Bj-VII e Cr 5 de *Bothrops jararacussu* e *Calloselasma rhodostoma* em camundongos (18-20g). Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio-padrão (SD) de um grupo com 4 animais.

## 5 DISCUSSÃO:

### 5.1 Discussão Geral:

Muita controvérsia tem sido encontrada na literatura sobre os venenos ofídicos, sendo parte conseqüência das diversas ações dos múltiplos componentes destes venenos (Jorge, 1995) e das diferentes características das serpentes que habitam os mais diversos locais.

A despeito das várias características tóxicas dos venenos de serpentes, estes têm sido bastante investigados, com o interesse de se isolar seus componentes e melhor conhecê-los para serem assim usados como ferramentas no estudo de processos biológicos diversos.

Observa-se que a maioria dos acidentes ofídicos ocorre em países tropicais (Warrel, 1996), pois, ou o tratamento médico não é ainda tão avançado ou estes países têm um numero maior de serpentes venenosas comparado com os demais países.

O problema maior é que as conseqüências destes acidentes não têm recebido merecida atenção nestes países sendo deficientes os registros de acidentes ofídicos como caso de saúde pública.

No entanto, embora a atenção ainda seja discreta, os acidentes ofídicos na América do Sul, suas implicações e importância clínica e biotecnológica, como ferramentas moleculares, merecem os esforços envolvidos na busca por se conhecer melhor o veneno e seus componentes e assim, evitar que os acidentes ofídicos continuem sendo um risco para a saúde pública.

**CAPITULO 1 – PURIFICAÇÃO DO VENENO DE**  
***Calloselasma rhodostoma* (Cr-IV1 e Cr 5) E**  
**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS PLA<sub>2</sub> D49**  
**(Cr-IV1) E K49 (Cr 5).**

## **Capítulo 1.1 - Purificação e caracterização físico-química da PLA<sub>2</sub> D49 denominada Cr-IV1 proveniente do veneno de *Calloselasma rhodostoma*.**

As PLA<sub>2</sub> de serpentes são os componentes mais abundantes e interessantes do ponto de vista biológico (Kini, 2003). As serpentes provenientes da família Viperidae possuem veneno que contém proteínas e peptídeos que afetam diferentes sistemas fisiológicos além de desempenharem diferentes atividades farmacológicas.

No Brasil as serpentes botrópicas são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos (Ministério da Saúde, 2001) e no sudoeste da Ásia as serpentes *Calloselasma rhodostoma* são as principais causadoras de morte por envenenamento ofídico (Tsai et al, 2001), ou seja, ambas são importantes epidemiologicamente em seus respectivos ambientes.

As serpentes *Bothrops jararacussu* e *Calloselasma rhodostoma*, pertencem à mesma família e subfamília, mas, se encontram separadas geograficamente.

As isoformas de PLA<sub>2</sub> Bj-IV e Bj-V purificadas e caracterizadas parcialmente (Bonfim et al., 2001 e 2006) no mestrado, e denominadas agora como 6-1 e 6-2 após a determinação da sua estrutura primária (Ponce-Soto., et al., 2006) foram isoladas a partir do veneno de *Bothrops jararacussu*.

A partir do veneno total de *Calloselasma rhodostoma*, foram isoladas novas miotoxinas PLA<sub>2</sub> (Cr-IV 1) e PLA<sub>2</sub> homólogas K49 (Cr 5), sendo neste trabalho caracterizadas estrutural e biologicamente. Como o intuito de continuar o trabalho realizado no Mestrado o objetivo inicial neste novo estudo foi isolar novas PLA<sub>2</sub> provenientes do veneno de *Calloselasma rhodostoma*, pois, se conhece que nos venenos de serpentes pode haver mais de uma PLA<sub>2</sub>, as conhecidas isoformas (Ponce-Soto et al., 2007b; Bonfim et al., 2006). Assim, ao estudarmos a literatura desta serpente asiática suspeitamos que pudesse haver outras PLA<sub>2</sub> ainda não fracionadas e que uma otimização nas técnicas de purificação poderia ser capaz de responder a esta suspeita.

No entanto, o grande problema para um bioquímico de proteínas que trabalha com a purificação destas é o cansativo trabalho para se encontrar as melhores estratégias e adequação da metodologia para cada caso específico, utilizando os diversos métodos de purificação que existem de maneira coerente com as características da fonte (no caso, o veneno) de onde se pretende purificar a proteína de

interesse e as propriedades da própria proteína em questão, já que a otimização do processo de purificação para um veneno pode não ser o melhor indicado para outro.

Assim, o processo de purificação de uma proteína não é tão simples, pois podem ser necessárias várias etapas que tem como objetivo a distinção da proteína em estudo, por isso, há de se ter cuidado com estas manobras, pois, durante estas pode haver perda de material, gasto de tempo experimental e de homogeneidade molecular. Um bioquímico de proteínas tem diferentes opções para se purificar uma proteína, mas, quando se trata de PLA<sub>2</sub>, normalmente o trabalho se inicia com exclusão molecular, seguida de troca iônica, finalizando com fase reversa, no entanto, este caminho não é uma regra.

Bonfim et al (2006) usando metodologias mais refinadas de purificação isolaram uma nova PLA<sub>2</sub> (chamada Bj-V), isoforma da Bj-IV (Bonfim et al., 2001) ambas provenientes da fração BthTX-II do veneno de *Bothrops jararacussu*. Ponce-Soto et al (2007a), com a mesma idéia de refinamento de técnicas cromatográficas, isolaram a BaTX, uma nova Lys49 a partir do veneno de *Bothrops alternatus*.

A literatura sobre o veneno asiático da serpente *Calloselasma rhodostoma*, mostra também uma combinação eficiente entre cromatografia de exclusão molecular (Superdex G75 HR 10/30 Pharmacia, Sweden) e fase reversa (C8 sílica gel, Vydac 14 x 250 mm) (Tsai et al, 2000), no entanto, fizemos algumas mudanças no protocolo de purificação com o objetivo de melhorar a resolução do perfil cromatográfico e assim decompor o veneno em todas as suas frações. As modificações se basearam na mudança de tampão, no tamanho e tipo de coluna usada, tanto para a etapa de exclusão molecular quanto para a etapa de fase reversa em HPLC.

A nova PLA<sub>2</sub> D49 proveniente do veneno de *Calloselasma rhodostoma* foi purificada a partir de uma metodologia otimizada com relação a já descrita na literatura (Tsai et al, 2000). Neste trabalho a purificação de uma nova PLA<sub>2</sub> D49 foi feita através de dois passos cromatográficos, um de exclusão molecular em coluna Protein-Pack 300 SW (0,78 cm x 3,30 cm) e outro de fase reversa em HPLC usando uma coluna de hidrofobicidade  $\mu$ -Bondapack C18.

O perfil de eluição do veneno de *Calloselasma rhodostoma* na coluna Protein-Pack 300 SW mostrou sete picos denominados de Cr-I a Cr-VII (Figura 1). Os picos Cr-III e Cr-IV mostraram atividade PLA<sub>2</sub> (Figura 4). A re-cromatografia da fração Cr-III por fase reversa em HPLC evidenciou três picos, denominados Cr-III 1, Cr-III 2 e Cr-III 3

(Figura 2), os quais foram identificados como (CRV-H1E6), (CRV-S1E6a) e (CRV-S1E6b), respectivamente (Tsai et al., 2000). A re-cromatografia da fração Cr-IV 1 evidenciou a presença de dois picos denominados de Cr-IV 1 e Cr-IV 2 (CRV-K49) (Tsai et al., 2000). Como mostra a Figura 2 cada proteína foi eluída como um único pico mostrando assim um alto grau de homogeneidade molecular (95%). A combinação de técnicas pode providenciar um melhor entendimento a respeito das proteínas que compõem um veneno e auxiliar o estudo destas, esclarecendo as possíveis discussões a respeito dos seus efeitos.

A fração Cr-IV 1, responsável por apresentar atividade PLA<sub>2</sub>, não havia ainda sido descrita na literatura, sendo assim alvo deste estudo. Mantivemos a reprodução do dado literário além de melhor resolve-lo já que obtivemos esta nova PLA<sub>2</sub> D49 (Cr-IV 1).

Em geral a otimização de um protocolo de purificação envolve muita experimentação do tipo tentativa e erro, especialmente pelo fato de que mesmo quando se conhece às características físico-químicas das proteínas a serem purificadas é necessário atenção, pois, é imprevisível o comportamento delas no decorrer do processo de purificação por isso, é muito interessante quando se consegue reduzir as etapas mantendo-se o alto grau de homogeneidade molecular e mais ainda quando, aliado a isto se revela à presença de alguma fração ainda não descrita, como é o caso da Cr-IV 1, ou descrita, porém, sem tantos detalhes.

Com relação à caracterização físico-química da PLA<sub>2</sub> D49 (Cr-IV 1), além de se confirmar o grau de pureza da proteína em estudo utilizando-se diferentes técnicas de sensibilidades variadas (eletroforese, espectrometria de massa e determinação da estrutura primária) busca-se um maior detalhamento da caracterização físico-química da proteína com o intuito de se compreender a intrincada relação estrutura-função.

O procedimento mais comum e simples para se atestar com boa certeza à pureza de uma amostra é a eletroforese em gel de poliacrilamida que é um método rápido e sensível, porém não tão confiável, pois separa as proteínas baseando-se somente em uma característica físico-química, seu peso molecular (Figura 3a).

Outra técnica analítica mais refinada, porém menos acessível é a espectrometria de massa, onde se deve constar apenas um íon molecular (ou os derivados de sua clivagem). A espectrometria de massa por MALDI-Tof confirmou a pureza da Cr-IV 1 e mostrou que esta proteína tem massa molecular de 13870.94 Da (Figura 3b) e seu

ponto isoelétrico (pI) foi teoricamente calculado com base na dedução da seqüência de aminoácidos, mostrando valor de 8,55.

No teste de atividade fosfolipásica a Cr-IV 1 mostrou-se ativa no substrato cromogênico sintético linear 4-nitro-(octanoyloxy) benzóico (Figura 4), evidenciando sua capacidade catalítica portanto, pertencente à classe II (Asp49) (Gutiérrez e Lomonte, 1995).

A análise da composição de aminoácidos também é uma etapa a se seguir em um trabalho de caracterização físico-química, esta é feita para se ter uma estimativa da composição global da proteína, quantos aminoácidos e quais compõem a proteínas em estudo. A composição de aminoácidos mostrou que a Cr-IV 1 apresenta alto conteúdo de resíduos de aminoácidos como Lys, Tyr, Gly, Pro e 14 meia-Cys, típico de PLA<sub>2</sub> básicas.

O alto grau de homologia de regiões diversas ou de domínios conservados responsáveis pela atividade catalítica sustenta a manutenção conformacional da cavidade hidrofóbica na região N-terminal que é altamente conservada em PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativas. Alterações nos aminoácidos desta região N-terminal reduzem a atividade catalítica (Slotboom e Haas, 1975), mostrando assim a importância destes. De acordo com Arni e Ward (1996) este canal permite ao substrato lipídico ter acesso ao sítio catalítico da PLA<sub>2</sub>.

Nas PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativas, há um conservado triplé de aminoácidos que contribui para a formação do canal hidrofóbico: F5, A93 e F96 (Valentin e Lambeau, 2002). O grau de identidade entre as PLA<sub>2</sub> D49 é muito alto em dois pontos, um na seqüência que corresponde à alça de ligação ao Ca<sup>+2</sup> (resíduos 24-34 YGCXCGXGGRG) e outro no sítio ativo (resíduos 42-54 DRCCFVHDCCYXK) (Valentin e Lambeau, 2002). A Cr-IV 1 é formada por 122 resíduos de aminoácidos, mostra alta homologia seqüencial com outras PLA<sub>2</sub> D49 e 72-79.3% de homologia na região associada com o sítio catalítico. A seqüência de aminoácidos da Cr-IV 1 mostrou que estas regiões são conservadas e diretamente ligadas com a catálise (Figura 5).

Segundo Arni e Ward (1996) algumas posições são de extrema importância para o desenvolvimento da atividade catalítica e pelo estudo de homologia seqüencial realizado com a Cr-IV 1, esta mostrou conservação em tais posições como, na posição 19-21 em que há predominância da seqüência PFY, na posição 24-29 a seqüência

YGCYCG, na posição 31-32 GG, na posição 34 encontra-se G, na posição 40-51 predomina a seqüência TDRCCFVHDCCY e na posição 66-67 YS (Figura 5).

O principal aspecto estrutural das enzimas encontradas na classe I e II é uma plataforma definida por duas longas pontes dissulfeto antiparalelas ligadas a  $\alpha$ -hélice (resíduos 37-54 hélice 2 e resíduos 90-109 hélice 3). Embora esta duas  $\alpha$ -hélices não exibam um claro caráter anfipático, as cadeias laterais de aminoácidos são geralmente exposta ao solvente e os resíduos hidrofóbicos apontam (se orientam) para o núcleo da proteína. Importantes exceções incluem aminoácidos que formam o aparato catalítico, o qual é conservado na Cr-IV 1 e localizado nas duas hélices (Figura 5).

## **Capítulo 1.2 - Purificação e caracterização físico-química da PLA<sub>2</sub> K49 denominada Cr 5 proveniente do veneno de *Calloselasma rhodostoma*.**

A nova PLA<sub>2</sub> homóloga K49 proveniente do veneno de *Calloselasma rhodostoma* foi purificada a partir de uma metodologia otimizada com relação a já descrita na literatura (Tsai et al, 2001). Neste trabalho a purificação da PLA<sub>2</sub> homóloga K49 foi feita através de um único passo cromatográfico em coluna  $\mu$ -Bondapack C-18 (0.78 cm x 30 cm; Waters 991-PDA) de fase reversa acoplada ao sistema de HPLC.

O perfil de eluição do veneno de *Calloselasma rhodostoma* na coluna  $\mu$ -Bondapack C-18 mostrou onze frações, denominadas de Cr 1 a Cr 11. Este perfil mostrou todas as frações anteriormente obtidas com a combinação dos dois passos cromatográficos discutidos acima para Cr-IV 1 mais a fração Cr 5, uma nova PLA<sub>2</sub> homóloga K49. A atividade PLA<sub>2</sub> foi realizada com a Cr 5 e esta se mostrou desprovida de atividade catalítica (dado não mostrado). Este é um primeiro indicativo de que a Cr 5 em estudo pertence ao grupo de PLA<sub>2</sub> homólogas K49, desprovidas ou com baixa atividade catalítica (Ownby et al., 1999).

As frações CRV-K49 (Tsai, 2000), CRV-H1E6, CRV-S1E6A e CRV-S1E6B (Tsai, et al., 2001) foram usadas como referência para a identificação das frações já descritas e como confirmação da reprodutividade, ou seja, obtivemos um novo perfil cromatográfico já que aperfeiçoamos o protocolo de purificação, e ainda mantivemos a reprodução do dado literário (Tsai et al, 2001), o que nos garante subsídios para compararmos nossos dados com a literatura e ainda reforçá-los.

O interessante desse novo “rumo” cromatográfico foi também mostrarmos como podemos conciliar técnicas de purificação refinadas e conciliarmos aquelas que melhor atendam ao nosso propósito, sem com isso perder reprodutividade e eficiência.

Um segundo indicativo de que a proteína em questão pertence à família das PLA<sub>2</sub> homólogas K49, ainda não descritas pela literatura, foi obtido quando a fração Cr 5, depois de isolada, foi seqüenciada. A pureza da Cr 5 foi confirmada através de HPLC de fase reversa, SDS-PAGE (Laemmli, 1970) e espectrometria de massa em MALDI-TOF, sendo que esta última técnica apresenta um erro muito baixo, em torno de  $\pm 0,1\%$  (Smolka et al., 2001).

O perfil eletroforético em SDS-PAGE mostrou que a PLA<sub>2</sub> em estudo é composta por uma única cadeia polipeptídica, resultado também exibido pela espectrometria de massa (MALDI-Tof), confirmando a pureza da Cr 5 além de mostrar que esta proteína tem massa molecular de 13.95 Da (Figura 11).

Têm sido reportadas formações diméricas em PLA<sub>2</sub> de venenos botrópicos como é o caso da miotoxina II proveniente de *Bothrops asper* (Francis et al., 1991) e piratoxina I e II proveniente de *Bothrops pirajai* (Toyama et al., 1995). Arni e Ward (1996) mostram a capacidade de algumas PLA<sub>2</sub> formarem tetrâmeros, como é o caso da BthTX-I de *Bothrops jararacussu* e a miotoxina proveniente do veneno de *Bothrops godmani*. Segundo Yamaguchi et al (1997) em algumas PLA<sub>2</sub> K49 homólogas a região dos resíduos 74-85 que compreende a hélice N-terminal e a região das folhas  $\beta$ -antiparalelas desempenham papel importante para a formação dos dímeros.

Neste trabalho o perfil da proteína Cr 5 em SDS-PAGE, condições reduzidas (R) e não reduzidas (NR), evidencia a característica de formação de agregados, neste caso dimérico, típico das PLA<sub>2</sub> (Figura 11a). Adiantando a discussão sobre a estrutura primária da Cr 5, esta apresenta a seqüência RE na posição (Arg98) e (Glu99) (Figura 13), presente em todas as PLA<sub>2</sub> Lys49 homólogas, o que poderia também contribuir fortemente para a formação dimérica.

O conhecimento e a comparação das estruturas cristalográficas podem ser importantes para o entendimento da base molecular desta atividade (Arni e Ward, 1996), além disso, a contribuição em termos de estrutura primária também pode ajudar no entendimento do mecanismo catalítico (Kini, 1997).

Assim, uma das maiores evidências de que a proteína está livre de contaminantes protéicos é obtido por seqüenciamento automático dos peptídeos, onde

se deve identificar apenas um aminoácido por ciclo. O número de seqüências de aminoácidos de PLA<sub>2</sub> provenientes de venenos de serpentes é grande, oferecendo dados disponíveis para um melhor entendimento da relação estrutura-função destas proteínas.

É característica na PLA<sub>2</sub> homóloga K49, a presença de um alto número de resíduos básicos de lisina na região C-terminal (Dua e Cho, 1994). A Cr 5 mostrou na sua composição de aminoácidos um alto conteúdo de resíduos de Lys, Tyr, Gly, Pro e 14 meia-Cys e quando comparada com outras miotoxinas e neurotoxinas PLA<sub>2</sub> K49, como a Miotoxina II (Francis et al., 1991), BthTX-I (Cintra et al., 1993) e a BaTX (Ponce-Soto et al., 2007a), evidenciou grande similaridade.

A comparação da seqüência da Cr 5 PLA<sub>2</sub> K49 revela um alto grau de homologia com outras proteínas da mesma família (70 a 95% de aminoácidos idênticos) (Selistre de Araujo et al., 1996). A estrutura primária da Cr 5 mostra que esta possui 94% de aminoácidos idênticos com outras PLA<sub>2</sub> K49 de origem botrópica (Figura 13).

A presença de glutamina na posição 11 (Q11) é típica nas PLA<sub>2</sub> K49, esta informação fortemente sugere que a Cr 5 faça parte desta família (Figura 13). Outras PLA<sub>2</sub> K49 homólogas apresentam leucina na posição 5 (L5) e glutamina na posição 11 (Q-11), em contraste com PLA<sub>2</sub> D49 que apresentam fenilalanina na posição 5 (F5).

As PLA<sub>2</sub> homólogas K49, as quais são enzimaticamente inativas, apresentam asparagina na posição 28 (N28) ao invés de tirosina (Y28) que garante a flexibilidade necessária da estrutura para que haja conexão com o íon Ca<sup>+2</sup>, leucina na posição 32 (L32) no lugar de glicina (G32) e, a substituição clássica que leva a perda de atividade catalítica, lisina na posição 49 (K49) ao invés de ácido aspártico como ocorre nas PLA<sub>2</sub> D49. Na seqüência primária da Cr 5 é possível encontrar asparagina na posição 28 (N28), confirmando o que normalmente acontece nas PLA<sub>2</sub> K49 homólogas.

Em todas as PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativas, há uma tríade catalítica conservada formada por His48, Tyr52 e Asp99, todas elas com uma conformação idêntica e ancorada por duas  $\alpha$ -hélices que contribuem para a hidrólise do substrato lisofosfolipídico (Ownby et al., 1999). As His48 e Asp99 junto com uma molécula de água estão envolvidos no ataque nucleofílico na posição sn-2 do substrato fosfolipídico. Para que este processo seja um sucesso, a estabilização do estado de transição do intermediário tetraedral é requirida (Scott et al., 1990). Nas PLA<sub>2</sub> D49 o íon cálcio é de grande importância e, os fatores essenciais para a estabilização deste intermediário

tetraedral estão relacionados à interação deste íon com a molécula de água e destes com o átomo de oxigênio carboxil das Asp49 e dos átomos de oxigênio carbonil da cadeia principal da alça de ligação ao cálcio.

Devido à substituição do ácido aspártico por lisina na posição 49, as PLA<sub>2</sub> Lys49 são incapazes de se ligarem ao cálcio, mas Pedersen et al (1994) têm demonstrado que algumas delas apresentam uma limitada, porém presente, atividade catalítica. A estrutura em cristal de duas PLA<sub>2</sub> Lys49 complexadas com seus substratos revela que estas proteínas têm habilidade de ligar substratos a seus sítios ativos (Scott et al., 1990). Lee et al (2001) propuseram que as PLA<sub>2</sub> Lys49 possuem atividade catalítica interrompida pois, o resíduo Lys122 hiperpolariza a ligação peptídica entre os resíduos Cys29 e Gly30 o que leva a uma falha na liberação do produto da reação.

Apesar de todos aparatos catalíticos, incluindo a tríade catalítica e o resíduo Tyr73, estar conservado na Cr 5 esta proteína não apresenta atividade catalítica (dado não mostrado), assim, pode-se inferir que a conformação da tríade na Cr 5 não seja responsável pela perda da habilidade catalítica e que a base estrutural para esta deficiência funcional necessite ser mais investigada.

O aminoácido Lys122 apresenta-se conservado em todas as PLA<sub>2</sub> homólogas Lys49, mas é raro nas PLA<sub>2</sub> Asp49. Lee et al (2001) consideraram a Lys122 como fundamental para a estabilização do ácido graxo na estrutura da PrTXII. Assim, infere-se que a Lys122 possa interagir com a carbonila da Cys29 hiperpolarizando a ligação peptídica entre a Cys29 e Gly30 e prendendo o produto, o ácido graxo, no sítio ativo, interrompendo assim o ciclo catalítico.

Outros autores suportam esta interação da Lys122, que é conservada em todas as PLA<sub>2</sub> homologas Lys49 diméricas exceto para um monômero da c-BthTX-I (Magro et al., 2003). No caso da Cr 5, a Lys111 encontrada na sua estrutura primária pode contribuir para a interrupção da catálise.

Nas PLA<sub>2</sub> Asp49 há uma seqüência de resíduos de glicina são eles: Gly26, Gly30, Gly32 e Gly33, mas na Cr 5 e em outras PLA<sub>2</sub> homologas Lys49 esta seqüência é incompleta. A substituição da Gly32 por Leu32 é a mutação mais comumente encontrada. A presença destes resíduos de glicina e da Tyr28 são importantes para a conformação flexível da estrutura que forma o sítio de ligação ao cálcio (Arni e Ward, 1996). A Tyr28 é substituída por Asn28 na Cr 5 e outras PLA<sub>2</sub> cataliticamente inativas o

que nos leva a sugerir que essa substituição não seja crucial para a ligação do cálcio na configuração do sítio catalítico, para que ocorra a catálise (Figura 13).

A intenção de aperfeiçoar/adequar os protocolos de purificação é garantir que o produto final, a proteína, tenha todas as características necessárias para seu uso, seja em diagnósticos ou para processos analíticos de interesse na pesquisa básica, como é o caso. Neste trabalho atingimos esta intenção, pois, a nova PLA<sub>2</sub> homóloga K49 (Cr 5) foi isolada do veneno total de *Calloselasma rhodostoma* em um único passo cromatográfico de fase reversa em HPLC ( $\mu$ -Bondapack C18) e sua caracterização físico-química, nos permitiram compreender melhor a expressão de novas isoformas ainda não descritas na literatura mas, de importância na sobrevivência da espécie.

**CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS  
PLA<sub>2</sub> D49 (6-1, 6-2 e Cr-IV1) e K49 (Bj-VII e Cr 5).**

## Capítulo 2.1 – Caracterização Biológica das PLA<sub>2</sub> D49 6-1, 6-2 e Cr-IV1.

As PLA<sub>2</sub> provenientes dos venenos aqui estudados (*Bothrops jararacussu* e *Calloselasma rhodostoma*) podem ser consideradas “sibling toxins” (membros de uma mesma família), ou seja, possuem similaridade estrutural, mas, podem diferir com relação aos efeitos farmacológicos.

A qualidade da preparação das proteínas a serem estudadas é de extrema importância para a investigação dos mecanismos de ação e da estrutura-função, pois, contaminantes contribuem para a invalidação dos dados, atrapalhando o estudo. Por exemplo, a presença de isoenzimas que normalmente são encontradas nos venenos de serpentes, como *Naja naja* e *Trimeresurus flavoviridis* que contém mais de 10 isoenzimas (Bragança e Sambray, 1967; Vishwanath et al., 1987., Singh et al., 2000), levaria a uma complicação no estudo das PLA<sub>2</sub> pois, estas isoenzimas podem exibir diferentes efeitos farmacológicos.

Embora seja válida esta preocupação, ela se descarta neste estudo, pois, métodos rigorosos e sofisticados foram aplicados no processo de purificação e caracterização físico-química assim, nesta parte do trabalho o interesse é discutir sobre a relação estrutura-função, pois, por exemplo, a função comum de hidrolisar os fosfolípidos na posição sn-2 e a falta de correlação entre atividade catalítica e toxicidade letal ou potência farmacológica (Rosemberg, 1997) faz o mecanismo pelo qual as PLA<sub>2</sub> induzem uma variedade de efeitos farmacológicos algo muito intrigante.

As PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 e Cr-IV1 são cataliticamente ativas, portanto consideradas PLA<sub>2</sub> D49, apresentam atividade farmacológica, porém, sabe-se que as PLA<sub>2</sub> podem induzir seus efeitos por mecanismos dependentes ou não da atividade catalítica (Kini, 2003). Assim, uma característica marcante das PLA<sub>2</sub> é sua alta afinidade em se ligar a proteínas específicas, as quais agem como receptores ou também chamados, aceptores ou proteínas alvo (Kini, 1997, 2003; Gutiérrez e Onwby 2003; Ponce-Soto, et al., 2007a e Gutierrez, et al., *in press*). Esta ligação específica é conferida pela presença de um sítio farmacológico em sua superfície o qual se acredita ser independente do sítio catalítico (Kini, 2003). Esta grande afinidade da PLA<sub>2</sub> com seu acceptor deve-se provavelmente a complementaridade de cargas e hidrofobicidade entre o sítio farmacológico da PLA<sub>2</sub> e o sítio de ligação da proteína acceptora.

Para o estudo das atividades farmacológicas foram utilizados modelos *in vivo* por serem mais fidedignos, pois, estudos *in vitro* às vezes mostram efeitos não específicos

que podem ser devido a outros fatores diferentes da toxina que se pretende estudar, podendo resultar em conclusões equivocadas. No entanto, os modelos *in vitro* não podem ser descartados devido à impossibilidade, muitas vezes, de se estudar *in vivo*, além destes modelos em geral, retratarem condições muito próximas as reais. Por exemplo, para o estudo de citotoxicidade realizado neste trabalho foi utilizado o modelo de células da musculatura esquelética (linhagem C2C12) por ser bastante confiável e utilizado (Gutiérrez e Lomonte, 2003). A literatura demonstra que miotubos diferenciados são alvos altamente susceptíveis a atividade citolítica das miotoxinas PLA<sub>2</sub> pertencentes ao grupo II (Bieber et al., 1994, Ponce-Soto, et al., 2007a, 2007b; Bonfim, et al., 2006b e Bonfim, et al., 2008).

Apesar das PLA<sub>2</sub> serem provenientes de diferentes fontes, há três regiões nas proteínas da classe I e II que apresentam alto grau de homologia seqüencial e estas contribuem para a formação de elementos estruturais secundários e terciários altamente conservados, incluindo a hélice N-terminal (resíduo 12), a região de ligação ao cálcio (resíduos 25-33) e a região do sítio ativo que juntos com alguns aminoácidos, como a Leu2, formam o “canal hidrofóbico” aonde se liga à cadeia do ácido graxo do fosfolípido. As regiões que exibem menor grau de homologia de aminoácidos correspondem a elementos estruturalmente menos conservados e são provavelmente determinantes na diversidade de efeitos farmacológicos exibidos pelas PLA<sub>2</sub> de venenos de serpentes (Arni e Ward, 1996).

Para se conhecer melhor as PLA<sub>2</sub> D49 6-1 e 6-2 e Cr-IV 1 foi feito um perfil das atividades tóxicas destas, iniciando-se pela investigação da sua atividade miotóxica. Segundo a literatura, a miotoxicidade tem sido definida como a habilidade das proteínas em induzirem necrose da musculatura esquelética *in vivo*, a partir de injeção intramuscular ou, *in vitro*, através da incubação com músculos esqueléticos diferenciados (Gutiérrez e Onwby 2003, Lomonte, et al., 2003).

As miotoxinas PLA<sub>2</sub> de procedência botrópica geralmente tem baixa ou nenhuma toxicidade sistêmica, em contraste com outras que apesar de apresentarem baixa miotoxicidade sistêmica, são fortemente neurotóxicas (Bonfim et al., 2006a; Ponce-Soto., et al., 2007a). Assim, o estudo de miotoxicidade local e sistêmica *in vivo* mostra que as PLA<sub>2</sub> D49 6-1 e 6-2 e Cr-IV 1, revelam ser miotoxinas com ação local mas sem atividade sistêmica, como demonstrado pelo baixo nível de CK plasmático quando estas proteínas foram administradas pela via intravenosa em camundongos. Este fato reforça

a hipótese de ação diferenciada para miotoxinas que agem local ou sistemicamente proposta por Gutierrez e Ownby (2003) e também a idéia de especificidade e não especificidade proposta por Kini (2003).

Além disso, a atividade catalítica pode ser importante para que as PLA<sub>2</sub> D49 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 exibam efeito miotóxico como o descrito por Díaz-Oreiro e Gutiérrez (1997). Este autor demonstra esta idéia quando modifica o resíduo His48 a partir da utilização de p-BPB e verifica queda na atividade miotóxica. Assim, fica aqui registrada a hipótese proposta pela literatura e o reforço dado pelos resultados obtidos com as PLA<sub>2</sub> aqui estudadas, de que a atividade catalítica pode ser importante na miotoxicidade das PLA<sub>2</sub> D49, porém, não essencial já que BaTX proveniente de *Bothrops alternatus* é capaz de desencadear atividade miotóxica e uma potente neurotoxicidade *in vitro* (Ponce-Soto et al., 2007a)

A atividade citolítica parece ser uma característica comum das PLA<sub>2</sub> provenientes do grupo II (Incerpi et al., 1995). Assim, as PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 foram estudadas em dois diferentes modelos, em cultura de mioblastos/miotubos (linhagem C2C12) (Figura 7) e fibroblastos (linhagem 3T3 e COS7) (Figura 8). O uso de dois modelos nos permite inferir sobre diferenças de sensibilidade nos modelos em estudo, por exemplo, a linhagem C2C12 é alvo altamente susceptível a atividade citolítica das miotoxinas do grupo II (Incerpi et al., 1995) e os fibroblastos possuem características bioquímicas e morfológicas que podem ser úteis como modelo de estudo para respostas celulares associadas a diversas patologias (Kato et al. 2002).

A lise da membrana celular induzida pelas PLA<sub>2</sub> D49 aqui estudadas foi avaliada através da liberação de LDH, similares alterações tem sido observadas com o veneno de *Agkistrodon*, *Trimeresurus*, *Crotalus* (Viperidae) e *Notechis* (Elapidae) (Lomonte. 1999).

As PLA<sub>2</sub> D49 aqui estudadas induziram citotoxicidade em mioblastos, sendo em miotubos menos expressivas (Figura 7). Esta atividade tem sido previamente descrita para outras PLA<sub>2</sub> D49 provenientes de *Bothrops jararacussu* (Ponce-Soto, et al., 2006). Assim, estes resultados apóiam a idéia de especificidade e inespecificidade proposta por Kini e Evans, (1989) e reforçada por Gutierrez e Onwby (2003) ao estabelecer a presença de sítios alvos presentes no músculo esquelético, ou no caso de receptores de tipo N no tecido nervoso (Valentin e Lambeau, 2000), porém, nos acreditamos

também na possível expressão diferenciada de receptores na linhagem C2C12 de mioblastos a miotubos.

Por outro lado, na Figura 8 verifica-se o estudo sobre a atividade citotóxica em duas linhagens de fibroblastos (3T3 e COS7) sendo a ação citotóxica das proteínas aqui estudadas mais proeminente nas células COS7 (Figura 8b). Estes resultados indicam que características bioquímicas e morfológicas da linhagem COS7 renderam a estas células maior susceptibilidade ao mecanismo tóxico das PLA<sub>2</sub> D49, sendo que esta diferença de susceptibilidade pode estar correlacionada à existência de sítios alvos na membrana plasmática similares a aqueles encontrados nas células da musculatura esquelética, como sugerido no parágrafo anterior.

A necrose da musculatura esquelética é uma consequência freqüente nos casos de envenenamento ofídico e tem-se registrado que as PLA<sub>2</sub> são de fundamental importância na patogênese deste efeito (Gutiérrez e Ownby 2003; Bonfim et al, 2006). Seguindo este raciocínio, pode-se sugerir que a citólise vista nas células de fibroblastos estudadas aqui podem contribuir para o efeito inflamatório e de necrose local.

Estes dados obtidos com as células de fibroblastos encorajam-nos a usar a linhagem de células 3T3 e COS7 como modelo *in vitro* no estudo dos mecanismos tóxicos intracelulares de ação dos venenos de serpentes e de suas proteínas, pois, os fibroblastos podem ser bons indicadores de toxicidade de vários componentes, incluindo proteínas provenientes de venenos de animais. Os fibroblastos são as mais abundantes células do tecido conjuntivo, da vizinhança das células musculares, das células adiposas e nervos periféricos, assim, sua função é primordial para as células e tecidos restantes (Junqueira e Carneiro, 2005).

Nos quadros de envenenamento causados por serpentes vipéridas e crotálicas a inflamação e a dor são características muito marcantes, pois, estes venenos são ricas fontes de PLA<sub>2</sub> miotóxicas. A inflamação é um evento complexo e multifatorial em que a permeabilidade vascular e o edema são um dos primeiros passos da resposta inflamatória, seguida por outros mecanismos responsáveis pela ampliação da resposta inflamatória e do dano tecidual (Vane, 1993).

O descobrimento de que as PLA<sub>2</sub> de mamíferos são chaves na liberação de ácido araquidônico tornou estas proteínas foco de muitos estudos devido ao fato de participarem no processo inflamatório. O mecanismo envolvido na ação pro – inflamatória das PLA<sub>2</sub> tem sido extensivamente estudado e parte do conhecimento dos

efeitos das PLA<sub>2</sub> secretadas tem vindo do uso de PLA<sub>2</sub> de venenos de serpentes como ferramentas, devido a sua alta homologia estrutural com PLA<sub>2</sub> secretadas humanas (Bomalaski et al., 1991; Kini e Evans, 1989).

As PLA<sub>2</sub> D49 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 induziram pronunciado efeito inflamatório (Figura 9), sendo que neste caso pode-se inferir que a hidrólise de fosfolipídeos pode ter contribuído para tal fenômeno, entretanto, este não é o único caminho pois, a PLA<sub>2</sub> homóloga K49 MT-II proveniente do veneno de *Bothrops asper* também induz atividade inflamatória (Zuliani et al., 2005), provavelmente estas proteínas homólogas K49 desempenhem seus efeitos farmacológicos através de interações eletrostáticas entre seus resíduos positivos e os sítios negativos nas membranas celulares, representados, por exemplo, por receptores presentes na membrana da célula alvo.

Asp49 e Lys49 exibem atividade edematogênica *in vivo*, apesar de em alguns casos este ser reduzido por inibidores catalíticos como p-BPB (Rosenberg, 1997; Landucci, 1998). Este inibidor também reduz a formação de edema estimulada pela miotoxina III, uma PLA<sub>2</sub> proveniente de *Bothrops asper* (Landucci, 2000). Assim, de acordo com a literatura, algumas PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativas desempenham função nos efeitos edematogênicos e as PLA<sub>2</sub> estudadas aqui 6-1, 6-2 Cr-IV 1 confirmam esta sugestão ao induzirem edema em camundongos usados como modelo (Chaves, 1998).

Os mecanismos pelos quais os venenos induzem o edema não estão claros, mais estudos são necessários para investigar com detalhes se as 6-1, 6-2 Cr-IV 1 induzem edema por produtos da lipoxigenase (de Faria. 2001) ou através de produtos da COX (ciclooxigenase-2) (Chaves, 1995) pois, sabe-se que é possível as PLA<sub>2</sub> exercerem função na expressão por exemplo, da enzima COX (Serhan.1994).

As PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 e Cr-IV 1, evidenciam através da rota i.c.v uma dose letal de 0,187 mg/Kg, 0,120 mg/kg e 0,070 mg/kg respectivamente e esta potência é parecida com outras PLA<sub>2</sub> provenientes da família Viperidae (Soares, et al, 2003), sugerindo que a atividade catalítica pode estar fortemente relacionada com a ação letal destas proteínas. Das três, a Cr-IV 1 mostra-se mais tóxica pois, foi necessária uma dosagem bem menor para que ocorresse 50% de morte na população. Esta rota é utilizada quando se quer “descarregar” agentes farmacológicos ao sistema nervoso central, diminuindo os efeitos sistêmicos (Bonfim et al, 2006).

## 2.2 – Caracterização Biológica das PLA<sub>2</sub> K49 homólogas Bj-VII e Cr 5.

As PLA<sub>2</sub>s provenientes de veneno de serpente têm adquirido considerável heterogeneidade de atividades tóxicas ao longo do processo microevolutivo (como neurotoxicidade, miotoxicidade, citotoxicidade dentre outras) (Ogawa et al., 1995). Estas ações não estão diretamente relacionadas à atividade fosfolipásica da PLA<sub>2</sub> e a distinção entre efeitos catalíticos e farmacológicos têm frequentemente sido discutido (Kini, 2003). Por exemplo, várias PLA<sub>2</sub> homólogas K49, com extremamente baixa ou ausente atividade catalítica, têm demonstrado miotoxicidade comparável a outras PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativas (Lomonte e Gutiérrez, 1989; Kihara et al., 1992).

Neste trabalho algumas atividades farmacológicas foram estudadas com as PLA<sub>2</sub> homólogas K49 Bj-VII e Cr 5 com o intuito de se ter mais informações a respeito desta família de proteínas. Dentre estas atividades o efeito miotóxico local e sistêmico foi analisado, pois a degeneração da musculatura esquelética é uma consequência comum em quadros de envenenamento ofídico e a PLA<sub>2</sub> um importante componente miotóxico no veneno. Também foi analisada a miotoxicidade *in vivo* para se correlacionar com a habilidade destas lisarem cultura de mioblastos, sendo esta cultura proposta como modelo de estudo para as PLA<sub>2</sub> do grupo II, provenientes de serpentes (Lomonte et al., 1999). Foi investigada ainda a atividade inflamatória, a partir do efeito edematizante das PLA<sub>2</sub>s em questão.

A miotoxicidade sistêmica induzida por venenos de serpentes tem sido evidenciada pela presença de fibras necróticas em vários músculos distantes do sítio de injeção (Salvini et al., 2001) ou pela quantificação de CK plasmático após a injeção *i.m* (intramuscular) e *i.v* (intravenosa) (Gutiérrez e Ownby, 2003).

As PLA<sub>2</sub> miotóxicas estão entre os principais fatores (além das metaloproteases, por exemplo, que agiria de maneira indireta) responsáveis pela necrose da musculatura esquelética observada em casos de envenenamento por serpentes (Gutiérrez e Lomonte, 1997) e, acredita-se que este evento ocorra devido à ligação das miotoxinas a membrana plasmática das fibras musculares (Dixon e Harris, 1996) levando a uma alteração na sua permeabilidade (Rufini et al., 1996).

Neste estudo sobre miotoxicidade foram feitas aplicações *i.m* e *i.v*, pois a partir destas duas vias pode-se distinguir entre as PLA<sub>2</sub> miotóxicas que agem de forma local ou sistêmica. As PLA<sub>2</sub>s homólogas K49 estudadas neste trabalho (Cr 5 e Bj-VII) apresentam efeito miotóxico, concordando com dados da literatura que dizem que a

atividade catalítica das PLA<sub>2</sub> pode ser central para o desencadeamento e potenciação de alguns efeitos tóxicos (Gutiérrez e Lomonte, 1989) mas não para todos os efeitos induzidos por esta família de proteínas.

Apesar de haver na literatura a sugestão de que a atividade catalítica seja essencial para a miotoxicidade em ambas, PLA<sub>2</sub> D49 e PLA<sub>2</sub> homólogas K49, ainda acreditamos que este efeito miotóxico seja mais dependente da região C-terminal rico em lisina (encontrada em ambas) que proporciona uma desestabilização da membrana, do que do sítio catalítico, porque se dependesse essencialmente deste segundo, as PLA<sub>2</sub> Bj-VII e Cr 5 não apresentariam efeito miotóxico como registrado pela Figura 14 (Gutiérrez et al., *in press*).

As PLA<sub>2</sub> K49 Cr 5 e Bj-VII injetadas intramuscular induziram uma rápida elevação do CK plasmático, o qual em camundongo atingiu um pico duas horas após a injeção, retornando ao normal após vinte quatro horas (Figura 14). A injeção intravenosa das mesmas proteínas não ocasionou elevação de CK, evidenciando um efeito proeminentemente local e não sistêmico (Figura 14), corroborando a literatura que relata as PLA<sub>2</sub> botrópicas com geralmente baixa toxicidade sistêmica ou ausente (Rosenberg, 1997).

Em geral, as PLA<sub>2</sub> que agem de maneira local se ligam a diferentes tipos celulares, além das células da musculatura esquelética, e são rapidamente “seqüestradas” após a injeção. Segundo Rovira (1992) estas podem se ligar a eritrócitos e outras células do sangue, o que dificulta a sua distribuição a compartimentos musculares. Contrário a isto, as PLA<sub>2</sub> que agem de maneira sistêmica tem uma maior seletividade para fibras musculares, não sendo então desviadas do seu alvo por se ligarem a outras células, podendo assim se difundir mais, alcançando, por exemplo, o sistema sanguíneo e músculos que podem estar distantes do local em que foram injetadas.

Este dado reforça novamente a hipótese de ação diferenciada de miotoxicidade local e sistêmica proposta por Gutiérrez e Ownby (2003) além de apoiar a idéia de especificidade e não especificidade proposta por Kini (2003).

Sobre o estudo da atividade citotóxica, numerosas investigações têm demonstrado que a citotoxicidade das PLA<sub>2</sub> homólogas K49 em vários tipos celulares não depende da hidrólise de fosfolipídeos (Mora et al., 2005). No caso de algumas PLA<sub>2</sub> homólogas K49, sua ação tem sido associada a regiões catiônicas e resíduos

hidrofóbicos localizados na região C-terminal (Núñez et al. 2001 e Chioato et al. 2003). Assim, justifica-se o estudo com as Bj-VII e Cr 5 pois, como uma PLA<sub>2</sub> homóloga K49 estas se constituem modelos interessantes para a investigação de uma variedade de efeitos celulares os quais independem da hidrólise de fosfolipídeos.

As homólogas PLA<sub>2</sub> Cr 5 e Bj-VII foram estudadas em cultura de mioblastos/miotubos (linhagem C2C12) para se investigar o efeito miotóxico *in vivo* ou simplesmente o efeito citotóxico. Ambas mostraram um potente efeito citotóxico tanto em mioblastos quanto em miotubos (Figura 15) e entre as PLA<sub>2</sub> aqui estudadas não houve grandes diferenças na indução da atividade citolítica induzidas pelas 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 (PLA<sub>2</sub> D-49) e Bj-VII e Cr 5 (PLA<sub>2</sub> K49 homóloga).

Em geral, as PLA<sub>2</sub> homólogas K49 provenientes das Américas têm 121 resíduos de aminoácidos, no entanto, a Cr 5 (aqui descrita sua estrutura primária) apresenta segundo sua caracterização físico-química, a perda de um aminoácido na região C terminal, entre as posições 110 e 120. Esta perda não interferiu nas atividades farmacológicas analisadas como, miotoxicidade local e sistêmica *in vivo*, inflamação e especialmente a citotoxicidade, que não é afetada mostrando alta variabilidade nesta região, conhecida como crítica para a atividade de dano de membrana ocasionado pelas miotoxinas K49.

Várias atividades biológicas desempenhadas pelas PLA<sub>2</sub> isoladas de venenos não dependem da atividade catalítica, mas, a região C-terminal, domínio KKYRYYLKPLCKK localizado entre os resíduos 115 e 129, da *Bothrops asper* é importante para a difusão da ação biológica de uma proteína cataliticamente inativa deste veneno e do peptídeo sintético feito a partir deste curto segmento, que apresenta atividade citolítica, mionecrótica e bactericida (Lomonte et al., 2003).

A região C-terminal (resíduos 115-129) é formada por um grupo de aminoácidos básicos e hidrofóbicos que desempenham relevante papel nas atividades citotóxicas e miotóxicas (Lomonte et al., 2003). As PLA<sub>2</sub> homólogas K49 Bj-VII e Cr 5 apresentam atividade miotóxica como mostra os altos índices de creatina quinase liberados (Figura 14), além da presença de cargas positivas na região C-terminal da Bj-VII (BthTX-I) (Cintra et al., 1993) e Cr 5, explicando o efeito miotóxico evidenciado na Figura 14.

A tentativa de se determinar os fatores responsáveis pelas atividades miotóxica e citotóxica baseando-se na comparação das seqüências primárias e na característica distribuição dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos é muito válida, mas, não explica

totalmente o reconhecimento dos domínios para estes efeitos. No entanto, quando estas informações são combinadas com outras características físico-químicas como, estudos de cristalografia, dicroísmo circular e mutagenesis-dirigida, estas nos permitem entender melhor a proteína em estudo (Kini e Evans, 1987; Arni e Ward, 1996).

Com relação à atividade edematogênica exercidas pelas PLA<sub>2</sub> Bj-VII e Cr 5, esta reforça o conceito de que as PLA<sub>2</sub> apresentam sítios específicos para a atividade farmacológica além daqueles envolvidos com a catálise, por exemplo, a PLA<sub>2</sub> homóloga K49 (BaPLA2I) isolada do veneno de *Bothrops atrox* (Kanashiro et al., 2002) causam degranulação *in vitro* de mastócitos e formação de edema através de mecanismos independentes do catalítico. A PLA<sub>2</sub> homóloga K49 (P3) de *Bothrops neuwiedii* desencadeia a formação de edema na ausência de atividade catalítica (Daniele et al., 1997), ou seja, para as Bj-VII e Cr 5, a hidrólise de fosfolípídeos parece não ser essencial para o desencadeamento desta atividade (Figura 16).

Assim, investiga-se a contribuição da carga positiva das Asp49 e Lys49 na formação do edema. Segundo a literatura, as cargas positivas destas podem contribuir com as suas propriedades farmacológicas. A heparina reduziu a formação de edema induzido por PLA<sub>2</sub> e PLA<sub>2</sub> homóloga K49 isoladas de *Bothrops asper*, reforçando esta idéia (Chaves et al., 1998) e no caso das PLA<sub>2</sub> aqui estudadas, este deve ser o provável caminho para o desencadeamento deste efeito.

O teste de letalidade foi realizado para analisar a quantidade de material (toxina) necessária para se matar metade de uma população de animais em teste com o intuito de se verificar a potência tóxica das toxinas em estudo no veneno bruto (total) do animal. A LD50 da Cr 5 foi 0.070 mg/Kg e da Bj-VII foi 0,081 mg/Kg de peso do animal quando estas foram administradas pela rota intracerebroventricular (*i.c.v*) em camundongo. A atividade catalítica não se fez necessária para que houvesse um reforço na letalidade das proteínas em estudo, como também é sugerido para outras PLA<sub>2</sub> tais como as isoformas 6-1 e 6-2 de *Bothrops jararacussu* (Ponce-Soto., et al., 2006) sendo neste estudo das proteínas Bj-VII e Cr 5, possivelmente a região C-terminal responsável pela ação letal destas.

A partir da análise da homologia seqüencial de uma proteína pode-se inferir sobre sua atividade biológica. A análise do alinhamento da Cr 5 com outras seqüências completas de PLA<sub>2</sub> homólogas K49 mostrou a presença de importantes mutações como, a substituição de F(3) por V(3), G(34) por H(34), Y(45) por F(45) e L(85) por

M(85) (Figura 13). Porém, estas substituições não modificaram as atividades biológicas estudadas neste trabalho, inferindo que estas substituições poderiam estar relacionadas a outros efeitos biológicos não analisados aqui.

Todos os efeitos biológicos induzidos pelas PLA<sub>2</sub> K49 (Cr 5 e Bj-VII) aqui estudados ocorreram na ausência de atividade catalítica mensurável *in vitro*, favorecendo a hipótese de mecanismos independentes da catálise exercidos pelas proteínas PLA<sub>2</sub> homólogas K49 (Lomonte et al., 2003; Kini, 2003; Gutiérrez e Ownby, 2003).

Sabe-se que tanto as PLA<sub>2s</sub> quanto as PLA<sub>2</sub> homólogas K49 de venenos de serpentes, exibem uma ampla variedade de efeitos farmacológicos devido a sua especificidade de interação/ligação com proteínas alvo. A alta seletividade e especificidade das toxinas de animal têm possibilitado seu uso como potenciais terapêuticos em tratamentos, por exemplo, da hipertensão além de serem candidatas ao desenvolvimento de novas drogas hipotensivas, como o Captopril (Gutiérrez, 2002).

No entanto, as diferenças funcionais entre as PLA<sub>2</sub> não são facilmente correlacionadas às suas diferenças de estrutura, assim, a similaridade estrutural faz a relação estrutura-função ser muito sutil, despertando o imaginário dos bioquímicos de proteínas e outros profissionais da área.

### **2.3 – Aspectos Estruturais e Funcionais das PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 procedentes de *Bothrops jararacussu* e Cr-IV 1 de *Calloselasma rhodostoma***

A figura 17 mostra que na região N-terminal a tríade própria das PLA<sub>2</sub>: Q(4), F(5) e I(9), é bem conservada, apenas algumas pequenas alterações são evidenciadas como, na posição 4, a PLA<sub>2</sub> Cr-IV e 6-1 mostra E(4) ao invés de Q(4) e na posição 5, a 6-1 apresenta W(5) ao invés de F(5). Apesar dessas diferenças pontuais em uma região que se acredita ser extremamente importante para a atividade catalítica (Arni e Ward 1996), as PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 e Cr-IV1 mostram-se cataliticamente ativas. Este fato sugere que provavelmente esses aminoácidos podem não ser cruciais para o desencadeamento da atividade enzimática, mas tais poderiam estar relacionados com a potência farmacológica destas proteínas (Bonfim, et al., 2001; Ponce-Soto, et al., 2006; Bonfim, et al., 2006; Bonfim, et al., 2008).

A presença de W5 na 6-1 e E(4) na Cr-IV 1 e 6-1 mostra que estes aminoácidos podem contribuir para a manutenção da conformação da cavidade hidrofóbica da região

N-terminal, que é altamente conservada nas PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativas, ou seja, apesar destas pequenas variações (como a mudanças de alguns poucos aminoácidos) pode não haver interferências na função expressa pela proteína pois, o canal hidrofóbico foi mantido e conseqüentemente sua função catalítica (Scott et al., 1994; Rigden et al., 2003; Ganziani et al., 1982; Ganziani et al., 1983; Arni and Ward, 1996).

Na região de ligação do cálcio a alteração ocorre na posição 30, V(30) ao invés de W(30) na PLA<sub>2</sub> Cr-IV 1 e, no sítio catalítico verifica-se uma mudança próxima à posição 49, F(46) no lugar de Y(46), no entanto, a seqüência 40-51 (TDRCCFVHDCCY), a posição 60(K) e 66-67 (SY), de extrema importância para o desenvolvimento da catálise, estão conservadas e as cisteínas que provavelmente se encontram formando as sete pontes dissulfeto, posições 26, 28, 43, 44, 50, 57, 75, 81, 86, 88, 95, 115 e 121, estão mantidas nas três PLA<sub>2</sub> D49. Estes fatos evidenciam um alto grau de homologia seqüencial da estrutura primária o que se traduz na atividade PLA<sub>2</sub> semelhante entre elas (Bonfim, et al., 2001, Bonfim, et al., 2006 e Bonfim, et al., 2008).

Embora ocorram algumas substituições de alguns aminoácidos entre as PLA<sub>2</sub> estudadas, os efeitos farmacológicos abordados mostram ser semelhante, exceto no caso do efeito miotóxico sistêmico *in vivo*, (Figura 6) onde a Cr-IV1 apresenta uma discreta atividade.

Sabe-se que as PLA<sub>2</sub> de origem botrópica (Gopalakrishnakone e Hawgood, 1984; Gutierrez e Onwby 2003) incluindo as PLA<sub>2</sub> homólogas K49, apresentam um efeito miotóxico local (Ponce-Soto, et al., 2007a) assim, esta discreta atividade na Cr-IV1 pode estar relacionada com aquelas pequenas alterações na região C terminal, embora a região rica em Lys permaneça conservada nas três PLA<sub>2s</sub> estudadas (Chioato e Ward 2003).

O estudo de filogenia entre as PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 e Cr-IV1, realizado através do algoritmo DNA Star, mostra na construção da árvore filogenética uma substituição nucleotídica de 11,3, provavelmente uma distância curta entre elas já que mantém alta similaridade, tanto estrutural quanto funcionalmente, sendo provenientes de serpentes da mesma família e subfamílias.

#### **1.4 Aspectos Estruturais e Funcionais das PLA<sub>2</sub> homólogas K49 Bj VII procedente de *Bothrops jararacussu* e Cr 5 de *Calloselasma rhodostoma***

Nas PLA<sub>2</sub> K49 homólogas, estudadas neste trabalho, a alça do cálcio (Figura 17), mostra a mudança na posição 34: G(34) por H(34) e no sítio catalítico muda-se Y(45) por F(45). Além disso, a seqüência CCF próximo à posição 49 que é típica das PLA<sub>2</sub> é exibida também pela Cr-5, uma K49, no entanto, estas mantêm a atividade catalítica residual ou ausente, como é próprio deste grupo de miotoxinas PLA<sub>2</sub> K49 homólogas (Ponce-Soto et al., 2007a).

Com relação à região C-terminal, esta se mostra bem conservada nas Bj-VII e Cr 5, evidenciando a presença de grande número de resíduos básicos que é característico nas K49 (Lomonte et al., 2003).

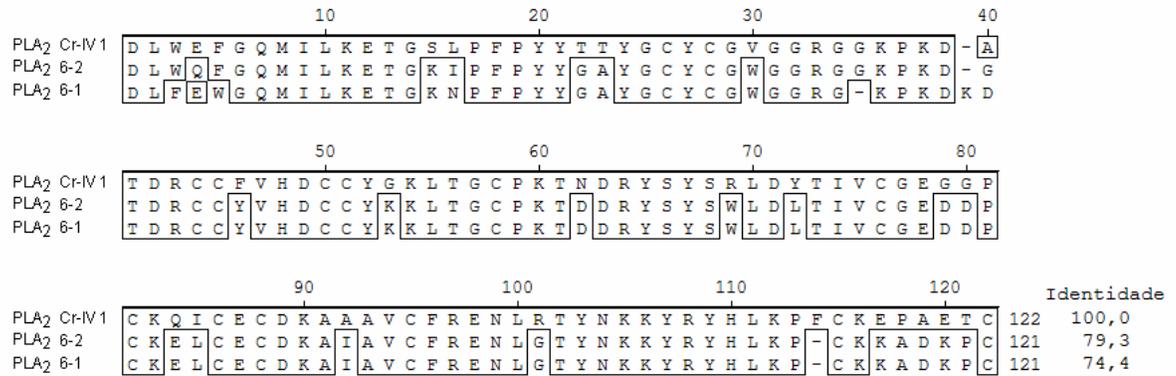
Segundo a literatura, nas PLA<sub>2</sub> K49 homólogas, a região N-terminal (1-17) esta envolvida com a miotoxicidade (Díaz et al., 1994) e as Bj-VII e Cr 5 mostram esta região bastante conservada. Os resíduos de aminoácidos K7, E12, T13 e K15 das Bj-VII e Cr 5 mais as lisinas K115 e K116 podem estar relacionadas a este efeito (Gutierrez., et al., *in press*).

O estudo de filogenia entre as PLA<sub>2</sub> K49 homólogas, Bj VII (BthTX-I) e Cr-5, realizado através do algoritmo DNA Star mostra na construção da árvore filogenética uma substituição nucleotídica menor que 5.9 (Figura 17), e muito menor quando este valor é comparado com o valor exibido pelas PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 e Cr-IV1. Assim, este resultado confirma a maior proximidade entre as Bj-VII e Cr 5 do que destas com relação a BaTX, embora todas pertençam a uma mesma família de proteínas.

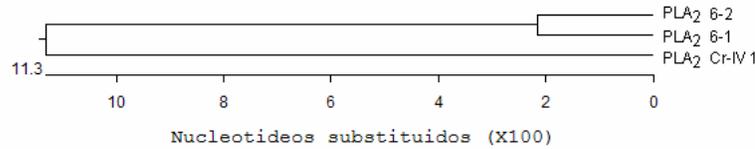
Assim, a manutenção de regiões envolvidas com atividades biológicas é de grande importância, pois, mesmo tendo sido separadas geograficamente, as serpentes aqui estudadas continuam a expressar PLA<sub>2</sub> e PLA<sub>2</sub> K49 homólogas muito parecidas, tanto estruturais como biologicamente, garantindo assim a permanência destas na natureza. Pequenas alterações de ordem estrutural parecem não ser suficiente para alterarem os efeitos biológicos, pois, a manutenção destes pode significar a sobrevivência ou não da espécie.

## Comparação das seqüências de aminoácidos das proteínas estudadas.

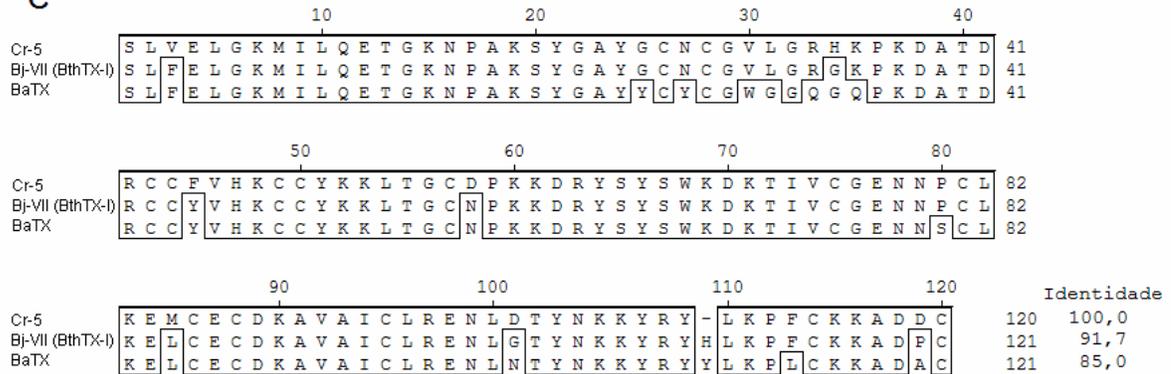
**A**



**B**



**C**



**D**

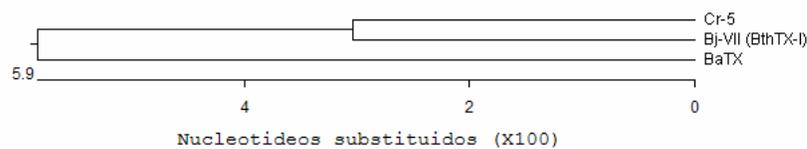


Figura 17a: Comparação das seqüências de aminoácido das PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 e CR-IV 1.

b) Árvore filogenética das PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 e CR-IV 1.

c) Comparação das seqüências de aminoácidos das PLA<sub>2</sub> K49 homólogas Cr 5, Bj-VII (BthTX-I) e BaTX.

d) Árvore filogenética das Cr 5, Bj-VII (BthTX-I) e BaTX.

## **CAPÍTULO 3: Produtos Da Tese.**

## Determination of Primary Structure of Two Isoforms 6-1 and 6-2 PLA<sub>2</sub> D49 from *Bothrops jararacussu* Snake Venom and Neurotoxic Characterization Using *in vitro* Neuromuscular Preparation

L. A. Ponce-Soto,<sup>1,3</sup> V. L. Bonfim,<sup>1</sup> L. Rodrigues-Simioni,<sup>2</sup> J. C. Novello,<sup>1</sup> and S. Marangoni<sup>1</sup>

In this paper we reported the purification, the biological characterization and the amino acid sequence of two new isoforms basic 6-1 (Bj-IV) and 6-2 (Bj-V) PLA<sub>2</sub> D49 purified from the *Bothrops jararacussu* venom.

The isoforms 6-1 and 6-2 had a sequence of amino acids of 121 amino acid residues 6-1: DLFEWQMIL KETGKNPFY YGAYGCYCGW GGRGKPKDKD TDRCCYVHDC CYKLLTGCPK TDDRYSYSWL DLTIVCGEDD PCKELCECDK AIAVCFRENL GTYNKKYRYH LKPKCKADKP C and *pI* value 7.83 and 6-2: DLWQFGQMIL KETGKIPFY YGAYGCYCGW GGRGGKPKDG TDRCCYVHDC CYKLLTGCPK TDDRYSYSWL DLTIVCGEDD PCKELCECDK AIAVCFRENL GTYNKKYRYH LKPKCKADKP C with a *pI* value of 7.99.

Skeletal muscle preparations from the young chicken have been used previously in order to study the effects of toxins on neuromuscular transmission, providing an important opportunity to study the differentiated behavior of a toxin before more than one model, because it shows differences in its sensibilities.

Both isoforms have produced neuromuscular blockade in young chicken biventer cervicis nerve-muscle preparations in presence or absence of crotoxin (F3 and F4) indicating that catalytic activity was not essential for neuromuscular action in this preparation.

**KEY WORDS:** Phospholipase A<sub>2</sub>; snake venom; *Bothrops jararacussu*; neuromuscular preparations; neurotoxic characterization

### 1. INTRODUCTION

The phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) [EC 3.1.1.4] belong to a large family of enzymes that hydrolyzes the sn-2 ester bond of phospholipids to liberate free fatty acids and lysophospholipids (Kini, 2003). PLA<sub>2</sub> has been classified into I–XII groups according to several criteria such as amino acid sequence similarity,

disulfide bond patterns, tissue specificity, cellular function and active splice variants (Six and Dennis, 2000). Group II of PLA<sub>2</sub> is formed secreted enzymes that includes those from viperidae snake venoms and the mammalian secretory enzymes.

Snake venom PLA<sub>2</sub>s displays a variety of activities, such as neurotoxicity, myotoxicity, cardiotoxicity and hemolysis that may be modulated by specific receptors located on target cells (Kini and Evans, 1989a–c; Gutiérrez and Ownby, 2003; Kini, 2003). Indeed, PLA<sub>2</sub> receptors classified as kinds M and N (Lambeau and Lazdunski, 1999) have been identified in various kinds of cells, including vascular smooth muscle cells, platelets, neutrophils,

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas, 6109, 13083 970, Campinas, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, Medical Sciences School, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: poncesoto@yahoo.com.ar

chondrocytes, fibroblasts, hepatocytes and mesangial cells, as well as in brain, lung and skeletal muscle (Bonventre and Sapirstein, 2002; Kudo and Murakami, 2002). Snake venom PLA<sub>2</sub> can bind to M receptors, which are the most common kind found in human macrophages and muscle cells, and these may mediate some of the deleterious actions of venom PLA<sub>2</sub>s, although that was not conclusively demonstrated (Gutiérrez and Ownby, 2003).

The increasing number of endogenous secretory PLA<sub>2</sub> identified in mammalian and the versatility of their receptor suggest that many biological roles of different secretories PLA<sub>2</sub> have not yet been discovered. The neurotoxic effect of the secretory PLA<sub>2</sub> from snake venom seems dependent on the interaction of the PLA<sub>2</sub> with a specific receptor in the nerve. Several studies have been carried out to investigate the molecular basis for this event, but despite numerous efforts this basis is still unclear.

This variety of pharmacological roles derives from an accelerated micro-evolutionary process through which a high rate of amino acid substitutions have occurred in molecular regions located mainly at the surface of these molecules (Kini and Chan, 1999; Kordis and Gubensek, 1997).

In this work, we described the determination of the primary structure and neuromuscular action in young chicken biventer cervicis nerve-muscle preparations of two isoforms PLA<sub>2</sub> D49 denominated 6-1 (Bj-IV) and 6-2 (Bj-V) from *Bothrops jararacussu* snake venom.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Whole Venom and Reagents

*Bothrops jararacussu* venom was collected from adult specimens captured in the State of São Paulo. All chemicals and reagents used in this work were from analytical or sequencing grade.

#### 2.1.1. Isolation and Purification of PLA<sub>2</sub> Isoforms

**2.1.1.1. Reverse phase HPLC (RP-HPLC).** Further purification of the *B. jararacussu* PLA<sub>2</sub> pool from ion-exchange chromatography was done as described (Toyama *et al.*, 1995). Five milligrams of the PLA<sub>2</sub> fraction were dissolved in 250 µl of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (solvent A) and the resulting solution was clarified by centrifugation prior to loading the supernatant onto a µ-Bondapak C-18

column (0.78 cm × 30 cm; Waters 991-PDA system). Proteins were eluted with a linear gradient (0–100%) of 66.5% (v/v) acetonitrile in 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (solvent B), at a flow rate of 2.0 ml/min. The elution profile was monitored at 280 nm and fractions were manually collected, lyophilized and stored at –20°C. The purified proteins obtained were referred as 6.1 and 6.2.

#### 2.1.2. Ion-exchange HPLC Chromatography

Further purification of the *B. jararacussu* PLA<sub>2</sub> pool from RP-HPLC. Five milligrams of the PLA<sub>2</sub> fraction were dissolved in 250 µl of 0.1% ammonium bicarbonate 0.05 M. The resulting solution was clarified by centrifugation and the supernatant was then applied in Protein Pack SP 5PW column (0.78 cm × 7.0 cm) at a constant flow rate of 1.0 ml/min. The samples were eluted using a linear gradient (0.05–1.0 M) of ammonium bicarbonate and the elution profile was monitored at 280 nm. Fractions containing PLA<sub>2</sub> activity were pooled, lyophilized and stored at –20°C.

#### 2.1.3. Electrophoresis SDS-page

The relative molecular mass of the protein was determined by SDS-PAGE (Laemmli, 1970). The molecular mass markers were (in kDa): phospholipase B – 94, albumin – 67, ovalbumin – 43, carbonic anhydrase – 30, soybean trypsin inhibitor – 20, and lysozyme – 14.

### 2.2. PLA<sub>2</sub> Activity

PLA<sub>2</sub> activity was measured using the assay described (Cho and Kézdy, 1991) and (Holzer and Mackessy, 1996), modified for 96-well plates (Ponce-Soto *et al.*, 2002). The standard assay mixture contained 200 µl of buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, pH 8.0), 20 µl of substrate (4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid), 20 µl of water and 20 µl of PLA<sub>2</sub> in a final volume of 260 µl. After the addition of PLA<sub>2</sub> (20 µg), the mixture was incubated for up to 40 min at 37°C, with the absorbance being read at 10 min intervals. The enzyme activity, expressed as the initial velocity of the reaction ( $V_0$ ) was calculated based on the increase in absorbance after 20 min.

All assays were done three times and the absorbances at 425 nm were measured using a

SpectraMax 340 multiwell plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### 2.3. Sequencing Procedure

Two milligrams of the purified protein were dissolved in 200  $\mu$ l of a 6 mol/l guanidine chloride solution (Merck, Darmstadt, Germany) containing 0.4 mol/l of Tris-HCl and 2 mM/l EDTA (pH 8.15). Nitrogen was blown over the top of the protein solution for 15 min; it was then reduced with DTT (6 M, 200  $\mu$ l) and carboxymethylated with <sup>14</sup>C-iodoacetic acid and icy iodoacetic acid. Nitrogen was again blown over the surface of the solution and the reaction tube was sealed. This solution was incubated in the dark at 37°C for 1 h and desalted using a Sephadex G25 column (0.7  $\times$  12 cm) with 1 mol/l acetic acid buffer.

The reduced carboxymethylated PLA<sub>2</sub> (RC-PLA<sub>2</sub>) protein was digested with *Staphylococcus aureus* protease SV8 for 16 h at 37°C; using a 1:30 enzyme to substrate molar ratio and the reaction was stopped by lyophilization. The RC-PLA<sub>2</sub> was also digested with clostripain for 8 h at 37°C and then lyophilized again. The digested products of these treatments were fractionated by reverse phase HPLC using a waters PDA 991 system and a C18  $\mu$ -Bondapak column. The elution of peptide peaks was made using a linear gradient consisting of 0–100% of acetonitrile in 0.1 % trifluoroacetic acid (v/v).

The sequencing of the N-terminal was conducted for the RC-PLA<sub>2</sub> protein, using a Procise automatic sequencer. The phenylthiohydantoin (PTH) amino acids were identified by comparing their retention times to the 20 PTH amino acid standards. Peptides containing <sup>14</sup>C-CM-Cys were monitored by detecting the radioactivity label using a liquid scintillation counter (Beckman model L- 8 250). The primary structure of the isoforms PLA<sub>2</sub> D49 6-1 and 6-2 was mainly building based on the purified peptides from the protein digested, protease SV8 and clostripain.

### 2.4. Neuromuscular Activity

#### 2.4.1. Young Chicken Biventer Cervicis Preparation

Male young chickens (4–8 days old) were killed with ether and the biventer cervicis muscle was removed (Ginsborg and Warriner, 1960) and mounted under a resting tension of 1 g in a 4 ml organ

bath containing aerated (95%O<sub>2</sub>–5% CO<sub>2</sub>) Krebs solution (pH 7.5, 37°C) of the following composition (in mM): NaCl 118.7, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 1.88, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.17, MgSO<sub>4</sub> 1.17, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 and glucose 11.65. A bipolar platinum ring electrode was placed around the tendon and indirect stimulation was applied with a Grass S4 stimulator (0.1 Hz, 0.2 ms, 3–4 V). Muscle contractions were recorded with a BG-10 GM Kulite displacement transducer coupled to a Gould RS 3400 recorder. After 20 min, contractures to exogenously applied acetylcholine (ACh, 110  $\mu$ M for 60 s) and KCl (13.4 mM for 120 s) were obtained in the absence of nerve stimulation prior to the addition of 6-1 and 6-2 and at the end of the experiment. The tissue was then allowed to stabilize for at least 20 min before the addition of 6.1 and 6.2 and these with crotopatin or crotoxin A (CA) from *Crotalus durissus collilineatus* venom. 6-1 and 6-2 CA were incubated in a molar ratio (CA:6.1 or CA:6.2) of ~1:1.

### 2.5. Statistical Analysis

The results are reported as the means  $\pm$  SEM. The significance of differences among the means was assessed by ANOVA followed by Dunnett's test when various experimental groups were compared to the control group. A value of  $p < 0.05$  indicated significance.

## 3. RESULTS

### 3.1. Isolation and Purification of PLA<sub>2</sub> Isoforms

Analysis of the RP-HPLC showed that fraction with PLA<sub>2</sub> activity was localized in the pick 6 and was eluted with of 58% of solvent B. It represents 25–30% from *Bothrops jararacussu* of the desiccated venom weight (Fig. 1a). The 6 fraction was re-purified in a column of ionic exchange Protein Pack SP 5PW (0.78  $\times$  8 cm). (Waters) coupled to an HPLC system and two peaks were eluted, 6-1 and 6-2, respectively (Fig. 1b).

To confirm the level of purity, peaks 6-1 and 6-2 were re-purified in a  $\mu$ -Bondapak C 18 column (0.78 cm  $\times$  30 cm; Waters 991-PDA system) in HPLC of the reverse phase, showing a high level of molecular homogeneity (95%), for the presence of a single peak for the isoforms 6-1 and 6-2, with a very small retention time difference (6-1: 46.69  $\pm$  0.34 min

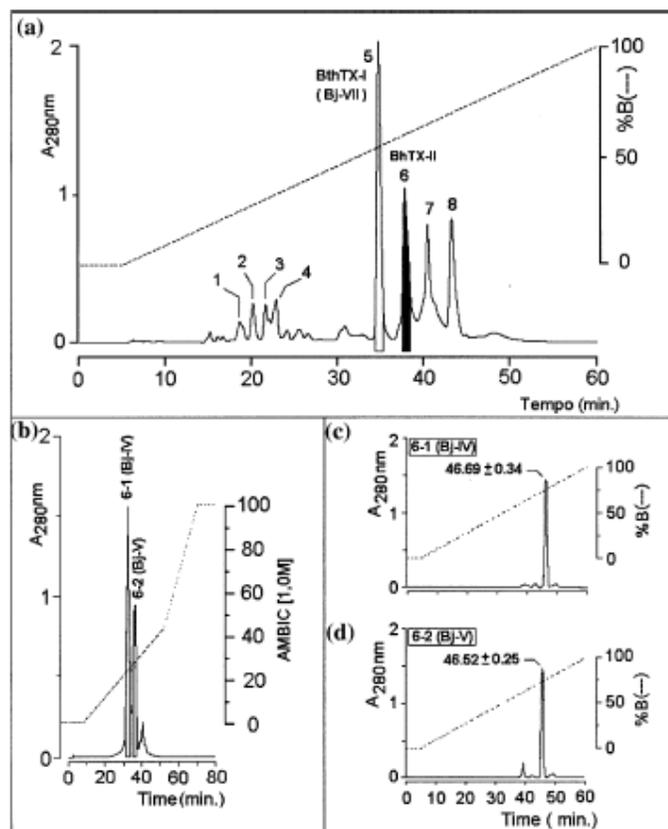


Fig. 1. (a) RP-HPLC chromatography of *Bothrops jararacussu* venom on  $\mu$ -Bondapak C 18 column (0.78 cm  $\times$  30 cm; Waters 991-PDA system waters). Samples of (5–10 mg) from venom was eluted with solvent B (acetonitrile, 0–66%) at 25°C. The elution profile was monitored at A 280 nm. (b) Ion-exchange chromatography of 6 peak on a Protein Pack SP 5PW column (0.78 cm  $\times$  7.0 cm) at a constant flow rate of 1.0 ml/min. The samples were eluted using a linear gradient (0.05–1.0 M) of ammonium bicarbonate and the elution profile was monitored at 280 nm. Fractions containing PLA<sub>2</sub> activity were pooled, lyophilized, and stored at –20°C. The two main fractions obtained are identified as 6-1 and 6-2. (c and d) Re-chromatography on RP-HPLC chromatography of the isoforms 6-1 and 6-2.

and 6-2:  $46.52 \pm 0.25$  min) (Fig. 1c and d). SDS-PAGE showed isoforms 6-1 and 6-2 had only band with molecular masses of 15 kDa, respectively (Fig. 1c and d).

### 3.2. Determination of Amino Acid Sequences of the PLA<sub>2</sub> Isoforms

The primary structure of isoforms PLA<sub>2</sub> 6-1 and 6-2 was determined by treating the purified enzyme with clostripain and protease SV8 followed by sequencing of the resulting peptides. Purified enzyme was used as a control for enzymatic digestion and appeared as a single major peak.

RP-HPLC of the peptide mixture obtained by digestion of isoforms PLA<sub>2</sub> 6-1 and 6-2 with clostripain, revealed the presence of 13 peptides for PLA<sub>2</sub> 6-1 and 15 peptides for 6-2 and the digestion with the protease SV8 resulted in 12 peptides for PLA<sub>2</sub> 6-1 and 14 peptides for 6-2 (not shown data). The primary structure of isoforms PLA<sub>2</sub> 6-1 and 6-2 was determined by comparing the sequences of the overlapping peptides purified from the above digests. Although various peptides have been purified and sequenced, only five (CLT-6, CLT-4, CLT-17, SV8-5, and SV8-8) were important for determining the primary structure of isoform 6-1, and only five to isoform 6-2 were purified and sequenced (CLT-3, CLT-8, CLT-10, SV8-6 and SV8-10) (Fig. 2a and

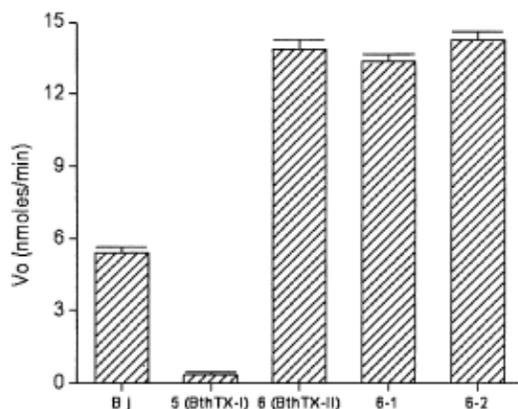


Fig. 2. PLA<sub>2</sub> activity of *Bothrops jararacussu* venom (Bj), peak 5 (BthTX-I), 6 (BthTX-II), 6-1 and 6-2 isoforms.

b). The results of primary structures of isoforms we have studied show the presence of some important mutations W3 → F5, Q4 → E4, F5 → W5 and L16 → N16.

The isoforms 6-1 and 6-2 are building by 121 amino acid residues each one and both showed high sequence homology among themselves and 90% with BthTX-II in the region associated with catalytic site (Fig. 3).

### 3.3. Activity Measurements of the PLA<sub>2</sub> Isoforms

The PLA<sub>2</sub> activity of 6-1 and 6-2 isoforms were studied using the synthetic chromogenic substrate 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoic acid.

The PLA<sub>2</sub> activity of whole venom (Bj) was 5.45 ± 2.5 nmol/mg/min, 5 (BthTX-I) was 0.35 ± 0.13 mol/mg/min, 6 (BthTX-II) 13.89 ± 0.39 nmol/mg/min, 6-1 was 13.35 ± 0.3 nmol/mg/min and 6-2 was 14.25 ± 0.36 nmol/mg/min (Fig. 2).

### 3.3.1. Neuromuscular Blockade

In biventer cervicis preparation of young chicken the isoforms 6-1 and 6-2, in the same dosage, had produced a discrete neuromuscular blockade in 120 min of experiment, both in absence and presence of crotopatins crotalics. (Fig. 4a and b).

## 4. DISCUSSION

Bothropstoxin II (BthTX-II) purified by conventional molecular exclusion and ion-exchange chromatography is a single-chain polypeptide of 120 amino acids with a calculated molecular mass of 13.98 kDa (Cintra *et al.*, 1993). Using HPLC ion-exchange chromatography followed by reverse phase HPLC (Bonfim *et al.*, 2001) obtained nine fractions named Bj I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII and IX being the Bj-IV characterized as a PLA<sub>2</sub> D49.

In this work, we have studied the venom from *Bothrops jararacussu* but we have utilized a new purification protocol and a reverse phase Bondapak C18 column (0.78 cm × 30 cm; Waters 991-PDA system) and we have obtained eight fractions. The fraction 6 was resubmitted to a purification stage, now in an ion-exchange column Protein Pack

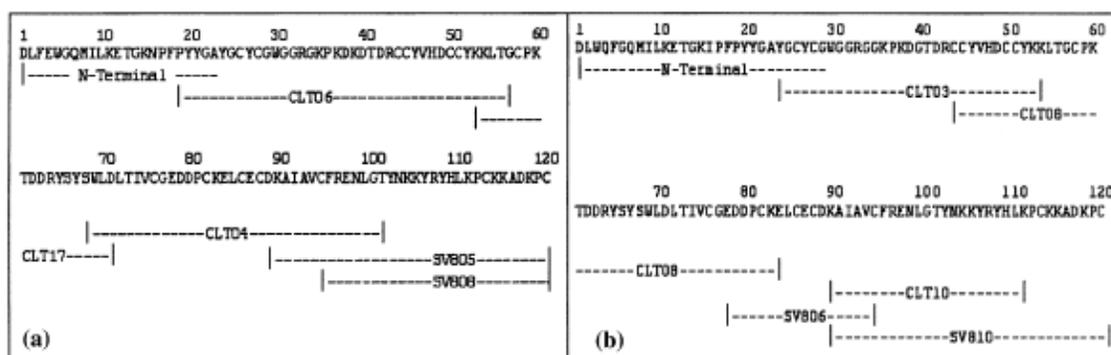


Fig. 3. Complete amino acid sequences peptide of (a) 6-1 and (b) 6-2 isoforms of PLA<sub>2</sub> based on peptides obtained by digesting the protein with clostripain (Cl) and protease V8 (SV8). RP-HPLC was done on a  $\mu$ -Bondapak C-18 (0.39 cm × 30 cm) column using a linear acetonitrile gradient at a flow rate of 1.0 ml/min. The complete amino acid sequence of 6-1 and 6-2 was deduced by overlapping the sequences of peptides and to 6-1 five peptides were important: CLT-6, CLT-4, CLT-17, SV8-5, and SV8-8 and 6-2: CLT-3, CLT-8, CLT-10, SV8-6 and SV8-10.



PLA<sub>2</sub> D49 and both are proceeding from the fraction BthTX-II before considerable homogeny.

Despite their diversity of sources, three regions in class I and II PLA<sub>2</sub>s retain a significantly high degree of amino acid-sequence homology. These regions contribute to the formation of the highly conserved secondary and tertiary structural elements including the N-terminal helix (residues 1–12), calcium binding (residues 25–33) and active site regions together with the amino acids forming the “hydrophobic channel” which binds the fatty-acyl chains of the phospholipid. The regions displaying a lower degree of amino acid homology correspond to structurally less conserved elements, and are likely determinants of the diverse pharmacology effects exhibited by venom PLA<sub>2</sub>s (Arni and Ward, 1996).

In addition to their contribution to the hydrophobic core, amino acids in the N-terminal helix play a further role in catalysis, since the modification of residues at the –NH<sub>2</sub> terminus reduces enzymatic activity (Slotboom and de Haas, 1975). The primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 shows the presence of some important mutations W3 → F5, Q4 → E4, F5 → W5 and L16 → N16 that are strategically positions to the expression of catalytic activity. The substitution of F5 for W5 suggests this residue may contribute to the conformational maintenance of hydrophobic cavity at the N-terminal region, that is high conservative to catalytically active PLA<sub>2</sub> since the W5 presence does not obstruct the catalytic function. According (Arni and Ward, 1996) this canal permits lipidic substrate gets access to PLA<sub>2</sub> catalytic site.

In the active PLA<sub>2</sub> there is a conserved triplet that contributes to form this hydrophobic wall: F5, A93 and F96 ((Emmanuel Valentin and Gérard Lambeau, 2000) which is conserved in the isoform 6-2 and 6-2 alone the amino acid is substituted F5 → W5 and the residues are conserved A93 and F96 (Fig. 3).

The level of identity between PLA<sub>2</sub> D49 is very high in the Ca<sup>2+</sup>-loop sequence (residues 24–34 YGCXCGXGGRG) and active site (residues 42–54 DRCCFVHDCCYXK) (Emmanuel Valentin and Gérard Lambeau, 2000). The amino acid sequences of the isoforms 6-1 and 6-2 shows these regions highly conserved and they are directly linked in the catalyses. (Fig. 3).

The major structural feature of the Class I/II enzymes is a platform defined by two long antiparallel disulphide linked  $\alpha$ -helices (helices 2 and 3, residues 37–54 and 90–109). Although these two  $\alpha$ -helices do not display a clear amphipathic

character, the hydrophilic amino acid side chains are generally exposed to the solvent and the hydrophobic residues point into the protein core. Crucial exceptions include the amino acids forming the catalytic network which are conserved, respectively, in the isoforms 6-1 and 6-2 and located on these two helices (Fig. 3).

Some authors, Kini and Iwanaga (1986a, b); Kini and Evans (1987, 1989a–c), Kini (2003) have proposed several models to explain PLA<sub>2</sub> catalytic and pharmacological activities. In these models PLA<sub>2</sub> has two separated places, one is responsible for catalytic activity and other for biological activity expression. In according to them, the pharmacological place would be located in the surface of PLA<sub>2</sub> molecules. In according to the model proposed by Kini and Evans, (1987), the anti-coagulant place would be located in a region between the 53 and 76 residues, considering this region charged positively in the PLA<sub>2</sub> with high anti-coagulant activity. In PLA<sub>2</sub> with moderate or low anti-coagulant activity, there is a predominance of negative chargings. This region is placed in a distinct local and separated of foreseen regions by neurotoxicity and myotoxicity.

In 6-1 and 6-2, the positions E53 are substituted by a residue of Lys, indicating these isoforms would maybe present a moderate anti-coagulant activity, explained by this substitution. The preparations of phrenic nerve muscle diaphragm isolated of mouse or *biventer cervices* of young chicken are the most utilized in the studies about toxins that act in the neuromuscular junction (Hodgson and Wickramaratna, 2002). The importance of studying different models is based on the fact that different species of snakes show venoms with different potencies upon several biological preparations. Then, according to Hodgson (1997), isolated diaphragm model of mouse is notably more sensitive than the *biventer cervices* of young chicken for the paradoxin, a  $\beta$ -neurotoxin isolated of the venom from snake *Oxyuranus microlepidotus*. The same disposition has been registered for taipoxin, textilodoxin and notexin, all  $\beta$ -neurotoxins from Australian elapidic snakes, contrasting with the crotoxin and the  $\beta$ -bungarotoxina that are more potent in young chicken (Chang, 1985).

The studies on BthTX-I and BthTX-II from the venom of *Bothrops jararacussu* have shown valuable informations with regard to myotoxic activity and sometimes neurotoxic one. (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; Queiroz *et al.*, 1984; Cintra, *et al.*, 1993; Honsi-Brandeburgo *et al.*, 1988; Bonfim *et al.*, 2001; Soares, *et al.*, 2002).

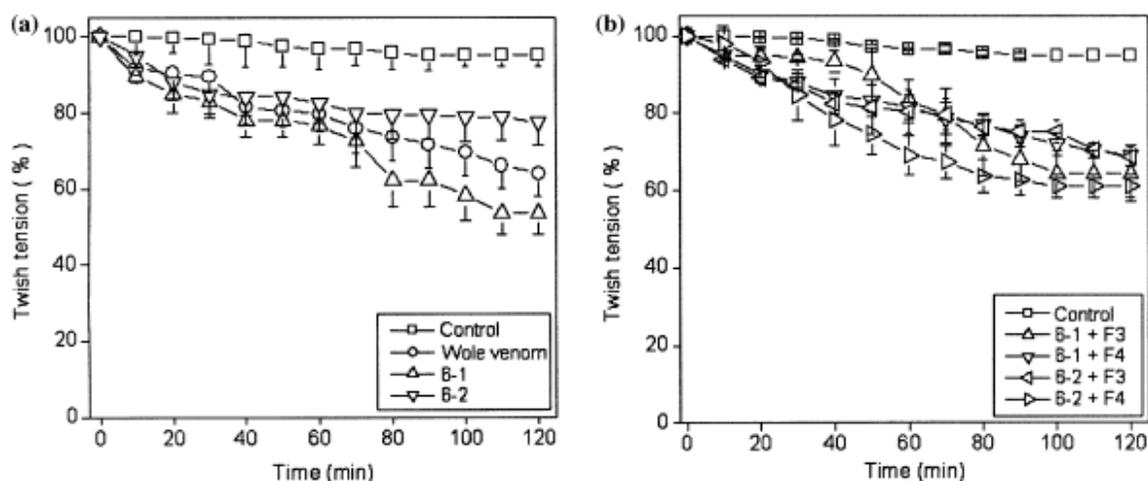


Fig. 5. (a) Graphic experiments of blockade effect of isoforms 6-1 and 6-2 and total venom from *Bothrops jararacussu*, in the dose of 50  $\mu\text{g/ml}$  in the preparation biventer cervicis of young chicken. (indirect stimulate). Control (○), total venom (□), 6-1 ( $\Delta$ ), and 6-2 ( $\nabla$ ). The Fig. 5b shows the graphic representation of blockade effect of isoforms 6-1 and 6-2 control (○), total venom (□), 6-1 + F3 ( $\Delta$ ), 6-1 + F4 ( $\nabla$ ), 6-2 + F3 ( $\triangleleft$ ), and 6-2 + F4 ( $\triangleright$ ) in the dose of 50  $\mu\text{g/ml}$  with isoforms of crotopotin crotalic from *Crotalus durissus collilineatus*.

Then, in this work, isoforms 6-1 and 6-2 PLA<sub>2</sub> D49 were characterized as neurotoxics *in vitro* biventer cervicis of young chicken in the dose of 50  $\mu\text{g/ml}$ . This experiment itself was made incubating the 6-1 and 6-2 with crotopotin crotalic isoforms (F3 and F4) of *Crotalus durissus collilineatus*, aiming at establishing the existence of a direct relation between catalytic and neurotoxic activity or a complementarity between them. The neurotoxic characterization *in vitro* of isoforms 6-1 and 6-2 in the same model, but incubated with crotopotin crotalic isoform (F3 and F4), showed the blockade effect of these PLA<sub>2</sub>, and it was not diminished in this preparation (Fig. 4b), confirming Kini (2003), who proposes an independency of pharmacological effect relating the catalytic one (Fig. 5).

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Paulo A. Baldasso and Marino Forner for general technical help. This work was supported by FAPESP and CAPES and is part of a Ph.D. thesis by Luis Alberto PonceSoto.

#### REFERENCES

- Arni, R. K., and Ward, R. J. (1996). Phospholipase A<sub>2</sub> a structural review. *Toxicon* 34: 827-41. Review.

- Bonfim, V. L., Toyama, M. H., Novello, J. C., Hyslop, S., Oliveira, C. R., Rodrigues-Simioni, L., and Marangoni, S. (2001). Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom. *J. Protein Chem.* 20: 239-45.
- Bonventre, J. V., and Sapirstein, A. (2002). Group IV cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) function: insights from the knockout mouse. *Adv. Exp. Med. Biol.* 507: 25-31. Review. No abstract available.
- Bülbring, E. (1946) Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1: 38-61.
- Chang, C. C. (1985) Neurotoxins with phospholipase A<sub>2</sub> activity in snake venoms. *Proc. Natl. Sci. Coun. Repub. China B* 9: 126-42. Review.
- Cho, W., and Kézdy, F. J. (1991). *Methods Enzymol.* 197: 75-79.
- Cintra, A. C. O., Marangoni, S., Oliveira, B., and Giglio, J. R. (1993). Bothropstoxin-I: Amino acid sequence and function. *J. Protein Chem.* 12: 57-64.
- Francis, B., Gutierrez, J. M., Lomonte, B., and Kaiser, I. I. (1991). Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub>. *Arch. Biochem. Biophys.* 284(2): 352-359.
- Ginsborg, B. L., and Warriner, J. (1960). The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. *Br. Pharm. Chemother.* 15: 410-1.
- Gutierrez, J. M., and Ownby, C. L. (2003). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42: 915-31. Review.
- Hodgson, W. C. (1997). Pharmacological action of Australian animal venoms. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 24(1): 10-17. Review.
- Hodgson, W. C., and Wickramaratna, J. C. (2002). In vitro neuromuscular activity of snake venoms. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29: 807-14. Review.
- Holzer, M., and Mackessy, S. P. (1996). An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A<sub>2</sub>. *Toxicon* 34: 1149-1155.

- Homsi-Brandeburgo, M. I., Queiroz, L. S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L., and Giglio, J. R. (1988). Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* 26: 615–27.
- Kini, R. M. (2003) Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Toxicon* 42: 827–40.
- Kini, R. M., and Chan, Y. M. (1999). Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *J. Mol. Evol.* 48: 125–32.
- Kini, R. M., and Evans, H. J. (1989a). A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.* 34: 277–86.
- Kini, R. M., and Evans, H. J. (1989b). A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon* 27: 613–35. Review.
- Kini, R. M., and Evans, H. J. (1989c). Role of cationic residues in cytolytic activity: modification of lysine residues in the cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom and correlation between cytolytic and antiplatelet activity. *Biochemistry* 28: 9209–15.
- Kini, R. M., and Iwanaga, S. (1986). Structure-function relationships of phospholipases. I: Prediction of presynaptic neurotoxicity. *Toxicon* 24: 527–41.
- Kini, R. M., and Iwanaga, S. (1986). Structure-function relationships of phospholipases. II: Charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* 24: 895–905. Review.
- Kini, R. M., and Evans, H. J. (1987). Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 262:(Oct 25), 14402–7.
- Kordis, D., and Gubensek, F. (1997). Bov-B long interspersed repeated DNA (LINE) sequences are present in *Vipera ammodytes* phospholipase A<sub>2</sub> genes and in genomes of Viperidae snakes. *Eur. J. Biochem.* 246: 772–9.
- Kudo, I., and Murakami, M. (2002). Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Prostag. Oth. Lipid. M.* 68–69: 3–58. Review.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lambeau, G., and Lazdunski, M. (1999). Receptors for a growing family of secreted phospholipases A<sub>2</sub>. *Trends Pharmacol. Sci.* 20(Apr), 162–70. Review.
- Moura-da-Silva, A. M., Paine, M. J., Diniz, M. R., Theakston, R. D., and Crampton, J. M. (1995). The molecular cloning of a phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom: evolution of venom group II phospholipase A<sub>2</sub>'s may imply gene duplications. *J. Mol. Evol.* 41(2), 174–179.
- Pereira, M. F., Novello, J. C., Cintra, A. C., Giglio, J. R., Landucci, E. T., Oliveira, B., and Marangoni, S. (1998). The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacucu) venom with low phospholipase A<sub>2</sub> activity. *J. Protein Chem.* 17:(4), 381–6.
- Ponce-Soto, L. A., Toyama, M. H., Hyslop, S., Novello, J. C., and Marangoni, S. (2002). Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA<sub>2</sub> from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *J. Protein Chem.* 21: 131–6.
- Queiroz, L. S., Santo Neto, H., Rodrigues-Simioni, L., and Prado-Franceschi, J. (1984). Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 22: 339–46.
- Rigden, D. J., Hwa, L. W., Marangoni, S., Toyama, M. H., and Polikarpov, I. (2003). The structure of the D49 phospholipase A<sub>2</sub> piratoxin III from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: possible relationship to cooperative substrate binding. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59:(Pt 2), 255–262.
- Rodrigues-Simioni, L., Borgese, N., and Ceccarelli, B. (1983). The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. *Neuroscience* 10:(2), 475–89.
- Six, D. A., and Dennis, E. A. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1488: 1–19. Review.
- Slothboom, A. J., and de Haas, G. H. (1975). Specific transformations at the N-terminal region of phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochemistry* 14(25): 5394–5399.
- Soares, A. M., Oshima-Franco, Y., Vieira, C. A., Leite, G. B., Fletcher, J. E., Jiang, M. S., Cintra, A. C., Giglio, J. R., and Rodrigues-Simioni, L. (2002). Mn(2+) ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 668–77.
- Toyama, M. H. (2000). Amino acid sequence of piratoxin-II, a myotoxic lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops pirajai* venom. *Biochimie.* 82(3): 245–250.
- Toyama, M. H., Mancuso, L. C., Giglio, J. R., Novello, J. C., Oliveira, B., and Marangoni, S. (1995). A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-I and II, two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom. N-terminal sequencing. *Biochem. Mol. Biol.* 37: 1047–1055.
- Toyama, M. H., Costa, P. D., Novello, J. C., Oliveira, B., de Giglio, J. R., da Cruz-Hoiling, M.A., and Marangoni, S. (1999). Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA<sub>2</sub> and anticoagulant activities and high myotoxic activity. *J. Protein Chem.* 18:(3), 371–378.

## Structural and Functional Properties of Cr 5, a New Lys49 Phospholipase A<sub>2</sub> Homologue Isolated from the Venom of the Snake *Calloselasma rhodostoma*

V.L. Bonfim,<sup>1</sup> L.A. Ponce-Soto,<sup>1,2</sup> J.C. Novello,<sup>1</sup> and S. Marangoni<sup>1</sup>

Cr 5 PLA<sub>2</sub> homologue (K49) was isolated from *Calloselasma rhodostoma* venom in only one chromatographic step in reverse phase HPLC (RP-HPLC) (on  $\mu$ -Bondapak C-18). A molecular mass of 13.965 Da was determined by MALDI-TOF mass spectrometry. The amino acid composition showed that Cr 5 had a high content of Lys, Tyr, Gly, Pro, and 14 half-Cys residues, typical residues of a basic PLA<sub>2</sub>. The complete amino acid sequence of Cr 5 PLA<sub>2</sub> contains 120 residues, resulting in a calculated *pI* value of 5.55. This sequence shows high identity values when compared to other K49 PLA<sub>2</sub>s isolated from the venoms of viperid snakes. Lower identity is observed in comparison to D49 PLA<sub>2</sub>s. The sequence found was SLVELGKMIL QETGKNPAKS YGAYGCNCGV LGRHKPKDAT DRCCFVHKCC YKKL TGCDPK KDRYSYSWKD KTIVCGENNP CLKEMCECDK AVAICLRENL DTYNKKYRYL KPFCKKADDC. In mice, Cr 5 induced myonecrosis and edema upon intramuscular and intravenous injections, respectively. The LD<sub>50</sub> of Cr 5 was 0.070 mg/kg of the animal weight, by intracerebroventricular (i.c.v.) route. *In vitro*, the toxin caused rapid cytolytic effect upon mouse skeletal muscle myoblasts in culture. The isolation of this PLA<sub>2</sub> and the combined structural and functional information obtained classify Cr 5 as a new member of the K49 PLA<sub>2</sub> family, since it presents typical features from such proteins.

**KEY WORDS:** Phospholipase A<sub>2</sub>; Lys49; myotoxin; snake venom; *Calloselasma rhodostoma*.

### 1. INTRODUCTION

The phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>; EC 3.1.1.4) are hydrolytic enzymes, which cleave the *sn*-2 acyl bond of glycerophospholipids, releasing free fatty acids and lysophospholipids (Six and Dennis, 2000). Secretory PLA<sub>2</sub>s occur in a large variety of biological fluids such as pancreatic secretions, inflammatory exudates, and snake, arthropod and mollusc venoms. So far, such PLA<sub>2</sub>s have been classified into eleven groups, on the basis of their primary structure and the number and position of disulfide bonds (Six and Dennis, 2000).

Snake venom PLA<sub>2</sub>s constitute a puzzling group of molecules since, despite having highly conserved molecular regions and similar three-dimensional structure among each other, they display a variety of pharmacological activities, such as myotoxic, neurotoxic, anticoagulant, hypotensive, hemolytic, platelet aggregation inhibiting, bactericidal and pro-inflammatory activities (Kini, 1997). This diversity of pharmacological roles derives from an accelerated micro-evolutionary process through which a high rate of amino acid substitutions has occurred in molecular regions located mainly at the surface of these molecules (Kini and Chan, 1999; Kordis and Gubensek, 1997).

Envenomation caused by bites of *Bothrops* is often characterized by a complex series of pathological alterations, including neurotoxicity that is one of the activities poorly explored in the

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas, P.O. Box 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: poncesoto@yahoo.com.ar

bothropic envenoming. The venom of *Bothrops alternatus* is known as presenting phosphodiesterase, thrombin-like proteins (Smolka *et al.*, 1998), thrombin inhibitor proteins (Castro *et al.*, 1998), myotoxicity (de Perez *et al.*, 1996), potent hemorrhagic activity (de Roodt and Cominetti, 2003) and neurotoxic and cytotoxic actions. These last two actions are still to be better analyzed in this genus.

This work described the purification of a new PLA<sub>2</sub> homologous, K49, using one chromatographic step of RP-HPLC starting from total venom of *Calloselasma rhodostoma* and described the determination of the primary structure of this K49 PLA<sub>2</sub>, aiming to compare this structure with its biological effects and study some profiles of the toxic activities and their effects such as inflammatory activity and *in vivo* myotoxicity, trying to correlate Cr 5 ability in lysing cell culture of myoblasts and myotubes and also, local and systemic myotoxicity, being this last assay proposed as a study model for group II PLA<sub>2</sub>. (Gutiérrez and Ownby, 2003).

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Venom and Reagents

*Calloselasma rhodostoma* venom was collected from adult specimens captured from the Kentucky reptile Zoo (U.S.A.). All chemicals and reagents used in this work were from analytical or sequencing grade.

### 2.2. Reverse Phase HPLC (RP-HPLC)

Five milligrams of the PLA<sub>2</sub> fraction were dissolved in 250 µl of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (solvent A). The resulting solution was clarified by centrifugation and the supernatant was applied to a µ-Bondapak C-18 column (0.78 cm × 30 cm; Waters 991-PDA system). Proteins were eluted with a linear gradient (0%–100%) of 66.5% (v/v) acetonitrile in 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (solvent B), at a flow rate of 2.0 ml/min. The elution profile was monitored at 280 nm and fractions were collected, lyophilized and stored at –20°C. The purified protein obtained was referred to as Cr 5.

### 2.3. PLA<sub>2</sub> Activity

PLA<sub>2</sub> activity was measured using the assay described by (Cho and Kézdy, 1991) and (Holzer

and Mackessy, 1996), modified for 96-well plates by (Ponce-Soto *et al.*, 2002). The standard assay mixture contained 200 µl of buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, pH 8.0), 20 µl of substrate, (4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid), 20 µl of water and 20 µl of Cr 5 in a final volume of 260 µl. After the addition of Cr 5 (20 µg), the mixture was incubated for 40 min at 37°C, being the absorbance read at 10 min intervals. The enzyme activity, expressed as the velocity of the reaction (V), was calculated based on the increase in absorbance after 20 min. The assays were done in triplicate and the absorbances at 425 nm were measured using a SpectraMax 340 multiwell plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

### 2.4. SDS-PAGE

Tricine SDS-PAGE in a discontinuous gel and buffer system (Schägger and von Jagow, 1987) were used to estimate the relative molecular mass of the proteins. The molecular mass markers used were (in kDa): phospholipase B – 94, albumin – 67, ovalbumin – 43, carbonic anhydrase – 30; soybean trypsin inhibitor – 20, and lysozyme – 14.

### 2.5. MALDI-TOF Mass Spectrometric Analysis (MS)

The molecular mass of Cr 5 K49 PLA<sub>2</sub> homologous was analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry using a Voyager-DE PRO MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). One microliter of the sample in TFA 0.1% was mixed with 2 µl of the matrix sinapinic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid). The matrix was prepared with 30% acetonitrile and 0.1% v/v TFA and the mass of the protein was analyzed under the following conditions: accelerate voltage 25 kV, laser fixed in 2890 µJ/cm<sup>2</sup>, delay 300 ns and linear mode analysis (Smolka *et al.*, 2001).

### 2.6. Amino Acid Analysis

Amino acid analysis was done on a Pico-Tag amino acid analyzer (Waters Systems), as described by (Heinrikson and Meredith, 1984). The purified sample (30 µg) was hydrolyzed at 105°C for 24 h, in 6 M HCl acid (Pierce sequencing grade) containing

1% phenol (w/v). The hydrolysates were reacted with 20  $\mu$ l of the derivatization solution (ethanol: triethylamine: water: phenylisothiocyanate, 7:1:1:1, v/v) for 1 h at room temperature, after which the PTC-amino acids were identified and quantified by HPLC through the comparison of their retention times and peak areas with those from a standard amino acid mixture.

### 2.7. Reduction, Carboxymethylation of Protein and Digestion of Cr 5

One milligram of purified Cr 5 was dissolved in 6 M guanidine chloride (Merck) containing 0.4 M Tris-HCl and 2 mM EDTA (pH 8.1); this solution was reduced with DTT and then carboxymethylated with 14C iodoacetic acid (Ponce-Soto *et al.*, 2006). Desalting was performed on a Sephadex G-25 column in 1 M acetic acid at 25°C and the modified protein (RC-Cr 5) was lyophilized. The reduced and carboxymethylated protein was digested with protease V8 from *Staphylococcus aureus* for 17 h at 37°C, using a 1:30 enzyme-to-substrate molar ratio; the reaction was stopped by lyophilization. The reduced and carboxymethylated Cr-5 (RC-Cr 5) was also digested with Clostripain for 8 h at 37°C and then lyophilized again. The digested products of this treatment were fractionated by reverse-phase HPLC using a Waters PDA 991 system and a C-18  $\mu$ -Bondapak column. The elution of peptide peaks was made using a linear gradient consisting of 0%–100% of acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid (v/v).

### 2.8. Sequencing Procedure

The sequencing of the N-terminal region was conducted from the reduced and carboxymethylated protein (RC-protein) and the sequencing of peptide peaks in repurified digest products was established using a Procise f automatic sequencer (Applied). Peptides containing 14C-CM-Cys were monitored by the detection of radioactivity with the use of a liquid scintillation counter (Beckman model L-250). The primary structure of the Cr 5 D49 PLA<sub>2</sub> was built based mainly on the purified peptides from the protein digested, protease SV8 and clostripain.

Two milligrams of the purified protein were dissolved in 200  $\mu$ l of a 6 mol/l guanidine chloride solution (Merck, Darmstadt, Germany) containing

0.4 mol/l of Tris-HCl and 2 mmol/l EDTA (pH 8.15). Nitrogen was blown over the top of the protein solution for 15 min; it was then reduced with DTT (6 M, 200  $\mu$ l) and carboxymethylated with 14C-iodoacetic acid and icy iodoacetic acid. Nitrogen was blown once again over the surface of the solution and the reaction tube was sealed. This solution was incubated in the dark at 37°C for 1 h and desalted using a Sephadex G25 column (0.7  $\times$  12 cm) with 1 mol/l acetic acid buffer.

### 2.9. Myotoxic Activity

Groups of four mice (18–20 g body weight) received an intramuscular (i.m. and i.v.) injection of variable amounts of toxin, in 50  $\mu$ l of PBS, in the gastrocnemius. A controlled group received 50  $\mu$ l of PBS. At different time intervals, blood was collected from the tail into heparinized capillary tubes, and the plasma creatine kinase (CK; EC 2.7.3.2) activity was determined by a kinetic assay (Sigma 47-UV). Activity was expressed in U/l, each one defined as the phosphorylation of 1  $\mu$ mol of creatine/min at 37°C.

### 2.10. Edema-forming Activity

Groups of four mice (18–20 g) received a subcutaneous (s.c.) injection of toxin, 5  $\mu$ g in 50 ml of PBS, into the right footpad. The left footpad received 50 ml of PBS, as a control. After 3 h, mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation and both feet were cut off and weighed (Yamakawa *et al.*, 1976). Edema was expressed as the percent increase in weight of the right foot, as compared to the left one, and the minimum edema-forming dose (MED) was defined as the toxin dose inducing 30% edema.

### 2.11. Intracerebroventricular Lethal Activity

Different doses of toxin in 10 ml PBS were injected by intracerebroventricular (i.c.v.) route, in groups of five mice (18–20 g) under light ether anesthesia, using a Hamilton microsyringe (Gutiérrez *et al.*, 1986). A control group received PBS injection. Deaths were recorded after 24 h and the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) was estimated by the Spearman-Kärber method (World Health Organization, 1981).

### 2.12. Cell Cultures

The cell lineage C2C12 (ATCC CRL-1772) utilized in this study is a murine myoblast cell line, which can get fused and differentiate into myotubes. The C2C12 was routinely grown in Dulbeccos modified Eagles Medium (DMEM; Sigma D-5796) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Sigma F-2442), 2 mM glutamine, 1 mM pyruvic acid, penicillin (100 U/ml), streptomycin (0.1 mg/ml), and amphotericin B (0.25 µg/ml) in a humidified atmosphere with 7% CO<sub>2</sub> at 37°C. Cells were harvested from subconfluent monolayers grown in 25 cm<sup>2</sup> bottles after their detachment using trypsin (1500 U/ml) containing 5.3 mM EDTA, for 5 min at 37°C. The resuspended cells were seeded in 96-well microplates, at an approximate initial density of 1-4 × 10<sup>4</sup> cells/well, in the same growth medium. After reaching a confluence of 75%, usually in 3-5 days, the endothelial cells were utilized directly in the cytotoxicity assay described below. In the case of C2C12 myoblasts, after reaching that confluence, growth medium was replaced by differentiation medium, which consisted of DMEM supplemented with 1% FCS (Ebisui *et al.*, 1995). After 4-6 additional days of culture, when a vast proportion of long multinucleated myotubes was observed, cells were utilized in the cytotoxicity assays, as described below.

### 2.13. Cytotoxic Activity

Cytotoxic activity was assayed on murine skeletal muscle C2C12 myoblasts (ATCC CRL-1772) as described (Lomonte *et al.*, 1999). Variable amounts of toxin were diluted in assay medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 1% fetal calf serum) and added to the cells (myoblasts and myotubes) in 96-well plates, in a total volume of 150 µl per well. Controls for 0 and 100% toxicity consisted of assay medium and 0.1% Triton X-100, respectively. After 3 h at 37°C, a supernatant aliquot was collected for the determination of lactic dehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.27) activity released from damaged cells, using a colorimetric endpoint assay (Sigma 500C). Experiments were done in triplicate.

### 2.14. Statistical Analysis

The results are reported as means ± SEM. The significance of differences among the means was

assessed by ANOVA, followed by Dunnett's test, in which various experimental groups were compared to the control group. A value of  $p < 0.05$  indicated significance.

## 3. RESULTS

Analysis of the RP-HPLC showed that a fraction with PLA<sub>2</sub> activity was localized in the peak 5 and was eluted with 54% of solvent B (Fig. 1). This new PLA<sub>2</sub> from *Calloselasma rhodostoma*, denominated Cr 5 (13.955.456 Da determined by MALDI-TOF mass spectrometry), showed in SDS-PAGE only fragments with molecular masses of 15 and 30 kDa in reduced and non-reduced conditions, respectively (Fig. 2a) and its purity was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry (Fig. 2b).

Cr 5 contained 120 amino acid residues and showed a high degree of homology with K49 PLA<sub>2</sub> homologous, although this similarity decreases to 94.2% when compared with the PLA<sub>2</sub> homologous of other snake toxins. The amino acid analysis showed the following composition: Asp/Asn 7, Glu/Gln 5, Ser 4, Gly 13, His 2, Arg 5, Thr 14, Ala 6, Pro 11, Tyr 14, Val 4, Met 1, Cys 14 (determined after hydrolysis with 3 N mercaptoethanesulfonic acid), Ile 3, Leu 11, Phe 3, and Lys 12 showing that this protein is a basic PLA<sub>2</sub>. Amino acid analysis of Cr 5 revealed a high content of Lys (19) and hydrophobic or non-polar amino acids as well as 14 half-cysteine residues, suggesting the occurrence of seven disulfide bonds.

N-terminal sequence was obtained from the direct sequence of the RC-Cr 5 on the automatic sequencer, finding 11 amino acid residues (Fig. 3). The primary structure of Cr 5 was obtained from the sequencing of the peptide obtained after the treatment of RC-Cr 5 with protease SV08 and trypsin, followed by sequencing of the resulting peptides (Fig. 4). The primary structure of the Cr 5 K49 PLA<sub>2</sub> homologous was mainly built based on the purified peptides: SV8 3, SV8 7 and SV8 4 (from the enzymatic treatment of RC-Cr 5 with protease SV8) and Trp 2, Trp 6, Trp 9, Trp 12, Trp 5, Trp 9 (from the enzymatic treatment of RC-Cr 5 with Trypsin) and the primary structure of Cr 5 was determined by comparing the sequences of the overlapping peptides purified from the above digests.

The estimated *pI* derived from this sequence was 5.55. The purified Cr 5 did not present detectable

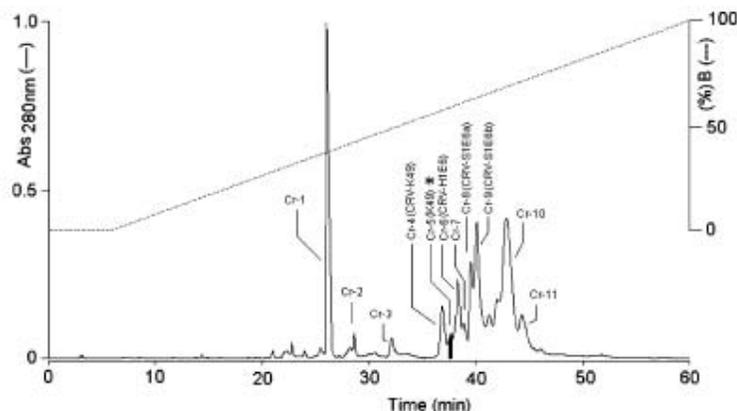


Fig. 1. RP-HPLC chromatography of *Calloselasma rhodostoma* venom on  $\mu$ -Bondapak C-18 column (0.78 cm  $\times$  30 cm; Waters 991-PDA system Waters). Samples of (5–10 mg) from venom was eluted with solvent B (acetonitrile, 0–66%) at 25°C. The elution profile was monitored at A 280 nm. The main fraction obtained is labeled as Cr 5. The CRV-K49 fraction (Tsai *et al.*, 2000), CRV-H1E6, CRV-S1E6A and CRV-S1E6B (Tsai *et al.*, 2001) are used like reference.

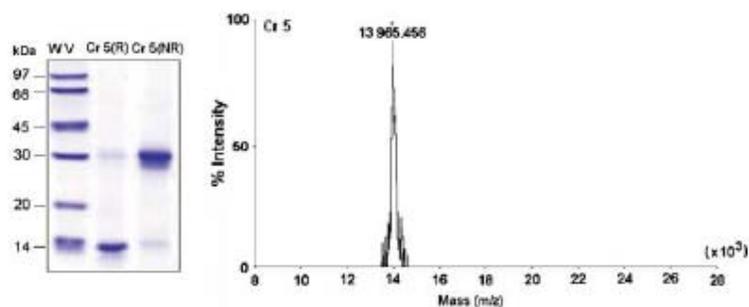


Fig. 2. Tricine SDS-PAGE profile of non-reduced (nr) and reduced (r) Cr 5. M: molecular mass markers ( $\times 10^{-3}$ ). Mass of Cr 5 as determined by MALDI-TOF mass spectrometry.

PLA<sub>2</sub> enzymatic activity on substrate, 4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid (data not shown).

*In vivo*, Cr 5 induced a conspicuous local myotoxic effect (i.m.), but not systemic (i.v.), evidenced by the rapid elevation of plasma CK activity through time-course, which reached a maximum effect 2 h after injection, and returned to normal by 24 h (Fig. 5).

Cr 5 also induced moderate footpad edema, with a MED of  $6.0 \pm 3 \mu\text{g}$ , evidencing the local increase in vascular permeability. After 3 h, the effect of edema formation diminishes, reaching basal levels after 24 h (Fig. 6).

The lethal activity of the Cr 5 by the i.c.v. route was low, with an estimated LD<sub>50</sub> value of 1,327.3  $\mu\text{g}$  for a 18–20 g mouse (0.070 mg/kg).

*In vitro*, Cr 5 rapidly lysed skeletal muscle myoblasts/myotubes with a dose of 40  $\mu\text{g}/\text{well}$  (40  $\mu\text{g}/150 \text{ ml}$ ), causing  $91 \pm 25\%$  lyses in myoblasts and  $91 \pm 0.8\%$  in myotubes (Fig. 7).

#### 4. DISCUSSION

The PLA<sub>2</sub>s are among the most abundant components of snake venoms, showing a wide array of activities in spite of their conserved overall structure (Valentin and Lambeau, 2000; Kini, 2003). Understanding the structural basis for their diverse toxic activities, including neurotoxicity and myotoxicity, is still a challenging task.



Fig. 3. The amino acid sequence alignment of Cr 5 with selected PLA<sub>2</sub> sequences obtained from the BLAST protein data bank (PubMed-Medline).

The *Calloselasma rhodostoma* venom is of great clinical importance and is widely distributed in Southeast Asia. The Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) is the most common cause of snakebites in Malaysia and Thailand. Despite the fact that only a small percentage of bites are fatal, the many victims suffer permanently debilitating injuries. (Warrel *et al.*, 1986).

The venom contains a variety of enzymes as phosphodiesterase, alkaline phosphomonoesterase, protease, phospholipase A, L-amino acid oxidase, hyaluronidase arginine ester hydrolase, arginine amidase and coagulant enzyme activities, being the understanding of this composition very important to better comprehend their biological behavior (Jennifer *et al.*, 1995)

In this work, we have studied the venom from *Calloselasma rhodostoma* utilizing a new purification protocol using a single pass chromatographic in a column  $\mu$ -Bondapak C-18 coupled to a system of reverse phase HPLC (0.78 cm  $\times$  30 cm; Waters 991-PDA system) and we obtained eleven fractions, denominated Cr 1-Cr 11. The peak with local myotoxicity and edematization activity was

registered in the fraction Cr 5, being this fraction a new myotoxin with no catalytic activity (Fig. 1). Cr 5 was isolated and sequenced, showing that it belongs to the Lys49 PLA<sub>2</sub> homologous family, still not described in the literature. The utilization of more refined methodologies and the combination of these techniques is of great value in order to provide a better understanding about the studied proteins and a clearly discussion about their effects.

The purity of Cr 5 was confirmed by RP-HPLC, SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry, which has an error of  $\pm 0.1\%$  in estimating the size of proteins with molecular masses of 1–40 kDa (Laemmli, 1970). The electrophoretic profile in SDS-PAGE showed that the PLA<sub>2</sub> is made up of a single chain polypeptide and MALDI-TOF mass spectrometry confirmed the purity of Cr 5 and showed that this protein had a molecular mass of 13.955 Da (Fig. 2b).

In the literature, it has been reported dimeric formation of PLA<sub>2</sub> in bothropic venoms including myotoxin II from *Bothrops asper* (Francis *et al.*, 1991), piratoxins I and II from *Bothrops pirajai*

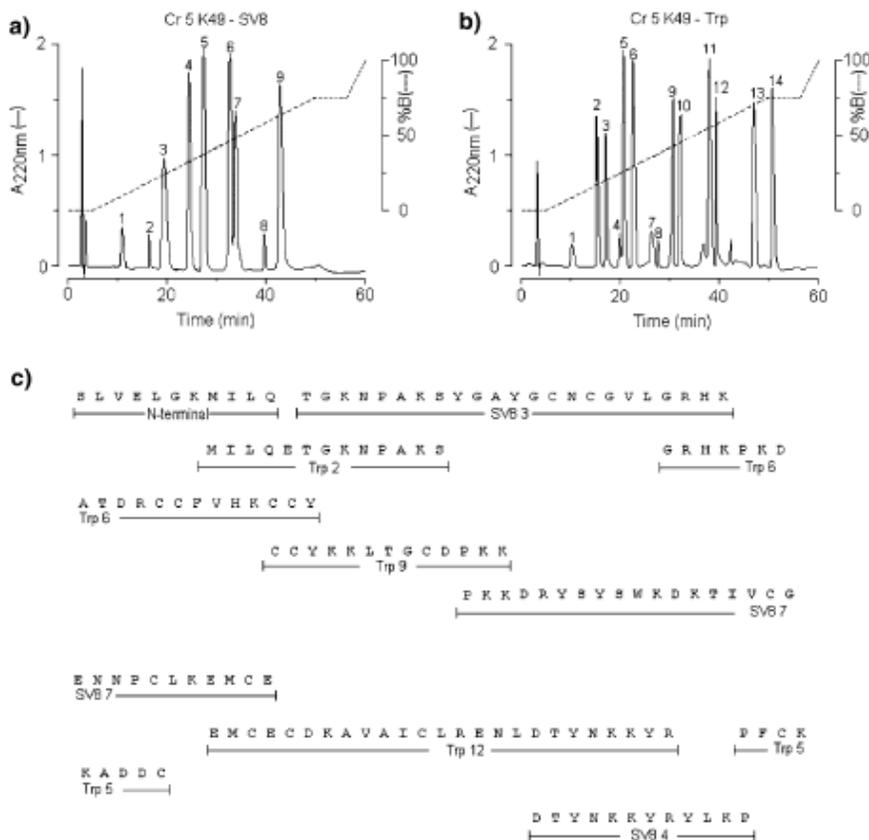


Fig. 4. (a–b) Elution of the peptides produced by digestion of RC-Cr 5 with protease trypsin bovine and protease SV8 from *Staphylococcus aureus*, respectively, reverse-phase HPLC was done on a  $\mu$ -Bondapak C18 column (0.39 cm  $\times$  30 cm) using a discontinuous acetonitrile gradient at a flow rate of 1.0 ml/min. (c) Complete amino acid sequence peptide of Cr 5 PLA<sub>2</sub> based on peptide obtained by digesting the protein with trypsin (Trp) and protease V8 (SV8). RP-HPLC was done on a  $\mu$ -Bondapak C-18 (0.39 cm  $\times$  30 cm) column using a linear acetonitrile gradient at a flow rate of 1.0 ml/min. The complete amino acid sequence of Cr 5 was overlapping the sequences of peptides and to nine peptides were important: SV8 3, SV8 7, SV8 4, Trp2, Trp6, Trp9, Trp12, Trp5 and Trp9.

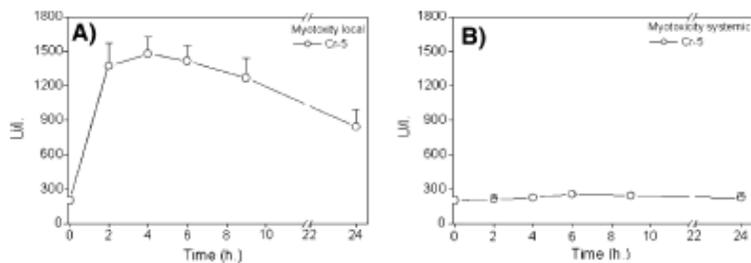


Fig. 5. Local and systemic myotoxicity activity of Cr 5 *Calloselasma rhodostoma* in mice. Groups of four male Swiss mice (18–20 g) were inject in the right gastrocnemius muscle and other groups inject intravenous, of toxin Cr 5 20  $\mu$ g/50  $\mu$ l of PBS. After 2, 4, 6, 9 and 24 h, blood was collected from the tail in heparinized capillary tubes and centrifuged for separation of the plasma. The activity of creatine kinase (CK) was then determined using 5  $\mu$ l of plasma, which was incubated for 3 min at 37°C with 1.0 ml of the reagent according to the kinetic CK-UV protocol from Sigma Chemical Co. The activity was expressed in units/liter, one unite corresponding to the production of 1  $\mu$ mol of creatine per minute. Time-course of the plasma creatine kinase (CK) increase after I.M and I.V injection of toxin.

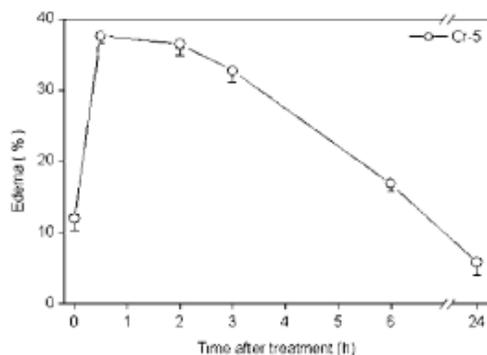


Fig. 6. Inflammatory activities of Cr 5 from *Calloselasma rhodostoma* in mice. Induction of edema by Cr 5. Groups of four mice (18–20 g) were injected in the subplantar region with dose of 5  $\mu$ g/50  $\mu$ l of PBS into right footpad. The left footpad received 50  $\mu$ l of PBS, as a control. After 0.5, 2, 3, 6 and 24 h, were sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation, and both feet were cut off and weighed (Yamakawa *et al.*, 1976). Edema was expressed as the percent increase in weight of the right foot, as compared to the left. Each point represents the means  $\pm$  SD of four animals.

(Toyama *et al.*, 1995), and MVI from *Bothrops moojeni* (Soares *et al.*, 1998). Ami and Ward (1996) showed that some PLA<sub>2</sub> occur as tetramers during crystal formation, as shown for BthTX-I from *Bothrops jararacussu* and a myotoxin from *Bothrops godmani*. In some Lys49 PLA<sub>2</sub>s homologous, the N-terminal  $\alpha$ -helix and an antiparallel  $\beta$  sheet in the region of residues 74–85 play a role in the formation of a molecular dimer (Yamaguchi *et al.*, 1997). Herein, we showed from the Tricine SDS-

PAGE profile of the non-reduced (NR) and reduced (R) protein, that Cr 5 confirms the characteristics of forming aggregates, dimers in this case, as typical for PLA<sub>2</sub> (Fig. 2).

The number of PLA<sub>2</sub> amino acid sequences from snake venoms is abundant, what offers more available data to better understand the function-structure relation of these proteins.

Amino acid sequences of K49 PLA<sub>2</sub> homologous proteins have been determined by both protein and DNA sequencing. Although more than forty D49 PLA<sub>2</sub> proteins have been sequenced, the sequences of only nine K49 PLA<sub>2</sub> proteins have been reported (Selistre de Araujo *et al.*, 1996).

The composition of amino acids showed that the fraction Cr 5 had a high content of Lys, Tyr, Gly, Pro, and 14 half-Cys residues and when compared with other myotoxic and neurotoxic K49 PLA<sub>2</sub>, like Myotoxin II (Francis *et al.*, 1991) and BthTX-I (Cintra *et al.*, 1993), evidenced a great similarity.

The comparison of Cr 5 K49 PLA<sub>2</sub> protein sequences reveals a high level of conservation within the K49 PLA<sub>2</sub> protein family (70–95% identity) (Selistre de Araujo *et al.*, 1996). Our results show that the primary structure of the Cr 5 possesses a high sequential homology (94%) with other K49 PLA<sub>2</sub> of bothropic origin (Fig. 4).

The alignment of the Cr 5 sequences with other K49 PLA<sub>2</sub> homologous complete sequences has shown the presence of some important mutations. Thus, Cr 5 shows the following substitutions: V  $\rightarrow$  F(3), H  $\rightarrow$  G(34), F  $\rightarrow$  Y(45), and M  $\rightarrow$  L(85) (Fig. 4). The fact that these substitutions do not

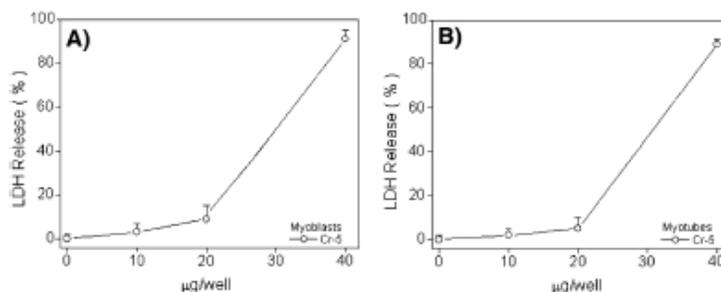


Fig. 7. Cytotoxicity of Cr 5 in murine C2C12 skeletal muscle myoblasts. Cytotoxicity (cytolysis) was estimated by the release of lactic dehydrogenase (LDH) into the culture medium after a 3 h exposure to Cr 5. The C2C12 was routinely grown in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma D-5796). Dose of 10, 20 and 40  $\mu$ g of toxin Cr 5 were diluted in assay medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 1% fetal calf serum) and added to the cells (myoblasts and myotubes) in 96-well plates, in a total volume of 150  $\mu$ l per well. Controls for 0 and 100% toxicity consisted of assay medium, and 0.1% Triton X-100, respectively. Each point represents the mean  $\pm$  SD of triplicate cell cultures.

modify the biological effects studied herein reveals that they could be related to other effects not analyzed in this work.

Trying to determine the responsible factors for the myotoxic and cytotoxic activities based on the comparison of these sequences and on the characteristic distribution of hydrophobic amino acids residues, does not fully confirm the recognition of the domains for such effects. However, when these information are tied together with other physical-chemical characteristics from crystallographic studies or even from circular dichroism and driven-mutagenesis, they allow us to better know and understand such proteins. (Kini and Iwanaga, 1986; Kini and Evans, 1987; Ami and Ward, 1996).

The enzymes PLA<sub>2</sub> K49 presents the amino acid glutamine in the position 11 (Q11). This finding strongly suggests that Cr 5 is a K49 PLA<sub>2</sub> homologous. Other K49 PLA<sub>2</sub> homologous present leucine in the position 5 (L5) and glutamine at the position 11 (Q-11), in contrast with the D49 PLA<sub>2</sub> that contains phenylalanine at the position 5 (F5). In fact, the myotoxins K49, which are enzymatically inactive, present asparagine at the position 28 (N28) instead of tyrosine (Y28), leucine at the position 32 (L32) in the place of glycine (G32), and obviously lysine at the position 49 (K49) instead asparagine in the D49 PLA<sub>2</sub>, being this last one a decisive substitution for the loss of the catalytic activity.

The residue tyrosine at the position 28 (Y28) presented in D49 of the active myotoxins is important for the flexibility of the conformation that structures the connection with the Ca<sup>2+</sup> (Arni and Ward, 1996).

In the primary structure sequence of the Cr 5 sample, it was possible to find asparagine at the position 28 (N28), confirming what usually happens in K49 PLA<sub>2</sub> homologous. The tyrosine in the position 28 (Y28) is characteristic of the D49 and is extremely important in the Ca<sup>2+</sup> ions fixation process in the catalytically active PLA<sub>2</sub>.

Unlike Lys49 proteins of American crotalids having 121 residues, the Cr 5 lacks one amino acid in the C terminal region, between the positions 110 and 120. This lack in the Cr 5 does not interfere in the pharmacological activities analyzed such as local and systemic myotoxicity *in vivo*, inflammation and, especially the cytotoxicity that is not affected showing the high variability in this region known to be critical for the membrane-damaging activities of Lys49 myotoxins.

In the active PLA<sub>2</sub>, there is a conserved catalytic triad consisting of His48, Tyr52, and Asp99, all of them with identical conformation and anchored by 2  $\alpha$ -helices that contribute to hydrolyze substrates into free fatty acids and lysophospholipids (Ownby *et al.*, 1999). It is known that His48 and Asp99, together with a nearby structurally conserved water molecule, are involved in the nucleophilic attack of the water molecule at the *sn*-2 position of the phospholipid substrate. For obtaining the best results of this process, the stabilization of a tetrahedral transition-state intermediate (Scott *et al.*, 1990) is required. For Asp49 PLA<sub>2s</sub> containing calcium ion, the essential factors stabilizing the tetrahedral intermediate are the interactions of the calcium ion with the catalytic water molecule, with the carboxyl oxygen atom of Asp49, and with the main-chain carbonyl oxygen atoms of the calcium-binding loop. Due to the substitution of asparagine for lysine on position 49, the Lys49 PLA<sub>2s</sub> are unable to bind calcium, but some of them have, however, demonstrated to have at least limited catalytic activity (Pedersen *et al.*, 1994). Moreover, the crystal structures of two Lys49 PLA<sub>2s</sub> complexed with their substrates reveal that these proteins have the ability to bind substrates to their active sites (Scott *et al.*, 1990). (Lee *et al.*, 2001) proposed that Lys49 PLA<sub>2s</sub> possess interrupted catalytic activity, since the residue Lys122 hyperpolarizes the peptide bond between residues Cys29 and Gly30, resulting in failure to release the reaction product.

Despite the fact that all the catalytic apparatus (including the catalytic triad and the Tyr73 residue) is conserved in the structure of the Cr 5 protein, it does not present catalytic activity in pattern assays (date not show). Therefore, it is clear that the local conformation of the triad in Cr 5 (Fig. 3) is not responsible for the lack of catalytic ability and the structural basis for this functional deficiency needs to be further investigated.

The amino acid Lys122 is absolutely conserved in all Lys49 PLA<sub>2</sub> but is rare in Asp49 enzymes. Lys122 was identified by (Lee *et al.*, 2001) as fundamental for the fatty acid stabilization in the PrTX-II structure. Then, it was proposed that Lys122 interacts with the carbonyl of Cys29 hyperpolarizing the peptide bond between Cys29 and Gly30 trapping the fatty acid product in the active site, interrupting the catalytic cycle.

The (Magro *et al.*, 2003) support this interaction of Lys122 that is conserved for all dimeric Lys49-PLA<sub>2s</sub> except for one monomer of *c*-BthTX-I.

In the case of Cr 5, the Lys111 is found in the primary structure and might contribute to the interruption of the catalysis.

In the Asp49 PLA<sub>2</sub> enzymes, there is a sequence of Gly residues, named Gly26, Gly30, Gly32 and Gly33. In Cr 5 and other K49 PLA<sub>2</sub> homologous, this sequence is incomplete. The replacement of Gly32 for Leu32 is the most common mutation noted. The presence of those Gly residues and of Tyr28 are important to the conformation flexibility that structures the calcium ion binding site (Arni and Ward, 1996). Tyr28 is usually replaced by Asn28 in Cr 5 and others catalytically inactive PLA<sub>2s</sub> shown in Fig. 3.

Several biological activities evoked by isolated PLA<sub>2</sub> did not depend on the catalytic activity but the C-terminal domain such as KKYRYLKLPLCKK, located between residues 115 and 129 of *Bothrops asper*, is important for the widespread biological action of this catalytically inactive protein and the synthetic peptide made from this short segment showed myonecrosis, cytolytic activities and bactericidal effects (Lomonte *et al.*, 2003).

At the C-terminus region (residues 115–129), a set of basic and hydrophobic amino acids play a relevant role in cytotoxic and myotoxic activities (Lomonte *et al.*, 2003). Cr 5 showed a myotoxic activity when assayed by creatine kinase release (Fig. 5). The positive charge presented in the Cr 5 C-terminal region explains the myotoxic effect evidenced in Fig. 5.

Biological macromolecules are much more flexible than small organic molecules, and conformational disorders in proteins can be either dynamic or static. Dynamic disorder can be due to thermal vibrations or to rotations around single bonds; a static disorder can result from slight displacements of parts of protein molecules in the crystal lattice or local differences in solvation. Relatively low resolution X-ray diffraction experiments give an average positional distribution for disordered atoms or residues. At ultrahigh resolution, however, it is possible to decipher the disorder and to view alternative conformations.

One of the interactions that appear to stabilize the crystallographic dimer is a pair of salt bridges between the disordered Arg107 and Glu108 residues. The two positively charged N<sup>+</sup> atoms of Arg107 in one monomer are hydrogen-bonded to the two negatively charged O atoms of Glu108 in the other (symmetryrelated) half of the dimer with the shortest contact distances being 2.75 and

2.98 Å. In addition, the Arg-Glu salt-bridge pairs are further stabilized by longer range electrostatic interactions with N and O in a distance shorter than 4 Å (Jelsch *et al.*, 1998). Cr 5 evidences in its primary structure, the sequence RE in the position (Arg98) and (Glu99) according to the Fig. 3, present in all the Lys49 PLA<sub>2</sub> homologous, which could also be contributing strongly for the dimeric formation, observing all those parameters established crystallographic for other Lys49 PLA<sub>2</sub> homologous.

The knowledge and the comparison of crystallographic structures could be important for the understanding of the molecular base of this activity (Ami and Ward, 1996), moreover this contribution in terms of primary structure also helps in the catalytic mechanism understanding.

A profile of toxic activities was investigated for Cr 5 from *Calloselasma rhodostoma*. Its effects include *in vivo* myotoxicity correlated with the ability of this Cr 5 to lyse cultures of myoblasts, proposed as a model for the study of snake venom group II PLA<sub>2s</sub> (Lomonte *et al.*, 1999).

Local and systemic skeletal muscle degeneration is a common consequence of envenomations due to snakebites and mass bee attacks. PLA<sub>2</sub> is an important myotoxic component in these venoms, inducing a similar pattern of degenerative events in muscle cells. The bothropics PLA<sub>2</sub> myotoxins generally have low systemic toxicity, in contrast to myotoxic PLA<sub>2</sub> that are also strongly neurotoxic (Rosenberg, 1997).

Our studies on local and systemic myotoxicity *in vivo* reveal that Cr 5 is a non-systemic myotoxin with local action due decrease of the plasmatic CK levels (Fig. 5). This fact reinforces the hypothesis of differentiated action of local and systemic myotoxicity proposed by (Gutiérrez and Ownby, 2003) and also the unspecificity and specificity proposed by (Kini, 2003).

LD<sub>50</sub> corresponds to the amount of a material, given all at once, which causes the death of 50% (one half) of a group of test animals. The LD<sub>50</sub> is one way to measure the short-term poisoning potential (acute toxicity) of a material. Therefore, to compare the toxic potency or intensity of different chemicals, researchers can measure the LD<sub>50</sub> effect. One way is to carry out lethality testing (the LD<sub>50</sub> tests) by measuring how much of a chemical is required to cause death. The LD<sub>50</sub> of Cr 5 was 0.070 mg/kg of the animal weight when administered in i.c.v. route in mice.

All these biological effects induced by the toxin occur in the absence of a measurable PLA<sub>2</sub> activity *in vitro*, further supporting the concept of catalytic-independent mechanisms exerted by Lys49 proteins (Lomonte *et al.*, 2003; Kini, 2003; Gutiérrez and Ownby, 2003).

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mr. Paulo A. Baldasso for general technical help. This work was supported by CAPES and FAPESP and is part of a PhD thesis by Vera Lucia Bonfim.

#### REFERENCES

- Arni, R. K., and Wand, R. J. (1996) *Toxicon* 34(8): 827–841, Review.
- Castro, H. C., Dutra, D. L., Oliveira-Carvalho, A. L., and Zingali, R. B. (1998). *Toxicon* 36(12), 1903–1912.
- Cho, W., and Kexdy, F. J. (1991). *Methods Enzymol.* 197: 75–79.
- Cintra, A. C. O., Marangoni, S., Oliveira, B., and Giglio, J. R. (1993). *J. Protein Chem.* 12: 57–64.
- de Perez, O. A., Kosciuszuk, P., Negrette, M. S., Teibler, P., and Ruiz, R. (1996). *Acta. Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.* 46(2): 97–102.
- Roodt, A. R.de, and Cominetti, M. R. (2003). *Acta. Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.* 41(8): 949–958.
- Ebisui, C., Tsujinaka, T., Morimoto, T., Kan, K., Ijima, S., Yano, M., Kominami, E., Tanaka, K., and Monden, M. (1995). *Clin. Sci.* 89: 431–439.
- Francis, B., Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., and Kaiser, J. I. (1991). *Arch. Biochem. Biophys.* 284(2), 352–359.
- Gutiérrez, J. M., and Ownby, C. L. (2003). *Toxicon* 42: 915–931.
- Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., Chaves, F., Moreno, E., and Cerdas, L. (1986). *Comp. Biochem. Physiol.* 84C: 159–164.
- Heinrikson, R. L., and Meredith, S. C. (1984). *Anal. Biochem.* 136(1), 65–74.
- Holzer, M., and Mackessy, S. P. (1996). *Toxicon* 34: 1149–1155.
- Jelsch, C., Pichon-Pesne, V., Lecomte, C., and Aubry, A. (1998). *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54(Pt 6 Pt 2), 1306–1318.
- Jennifer, C. D., Gnanajothy, P., Chai, K. S., Nget-Hong, T., Roger, S. T., and Wolfgang W. (1995). *Toxicon* 34: 67–79.
- Kini, R. M. (1997). *Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function and Mechanism.* Wiley, Chichester, England, pp. 1–511.
- Kini, R. M. (2003) *Toxicon* 4: 827–840.
- Kini, R. M., and Chan, Y. M. (1999). *J. Mol. Evol.* 48(2), 125–132.
- Kini, R. M., and Evans, H. S. (1987). *J. Biol. Chem.* 262(30), 14402–14407.
- Kini, R. M., and Iwanaga, S. (1986). *Toxicon* 24(6), 527–541.
- Kordis, D., and Gubensek, F. (1997). *Eur. J. Biochem.* 246(3), 772–779.
- Laemmlí, U. K. (1970) *Nature* 227(259), 680–685.
- Lee, W. H., da Silva Giotto, M. T., Marangoni, S., Toyama, M. H., Polikarpov, I., and Garrat, R. C. (2001). *Biochemistry* 40: 28–36.
- Lomonte, B., Angulo, Y., and Calderon, L. (2003). *Toxicon* 42(8):885–901, Review.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Rufini, S., Cho, W., Giglio, J. R., Ohno, M., Daniele, J. J., Geoghegan, P., and Gutiérrez, J. M. (1999). *Toxicon* 37: 145–158.
- Magro, A. J., Soares, A. M., Giglio, J. R., and Fontes, M. R. (2003). *Biochem. Biophys. Res. Commun* 311(3), 713–720.
- Ownby, C. L., Selistre de Araujo, H. S., White S. P., and Fletcher, J. E. (1999) *Toxicon* 37(3): 411–445, Review.
- Pedersen, J. Z., Arcuri, B. F.de, Moreno, R., and Rufini, S. (1994). *Biochim. Biophys. Acta.* 1190: 177–180.
- Ponce-Soto, L. A., Bonfim, V. L., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J. C., and Marangoni, S. (2006). *Protein J.* 25(2), 147–155.
- Ponce-Soto, L. A., Toyama, M. H., Hyslop, S., Novello, J. C., and Marangoni, S. (2002). *J. Protein Chem.* 21(3), 131–136.
- Rosenberg, P. (1997). In: Kini, R.M. (ed.), *Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, New York, pp. 129–154.
- Schägger, H., and Jagow, G.von (1987). *Anal. Biochem.* 166(2), 368–379.
- Scott, D. L., White, S. P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M. H., and Sigler P. B. (1990). *Science* 250(4987): 1541–1546.
- Selistre de Araujo, H. S., White, S. P., and Ownby, C. L. (1996). *Arch. Biochem. Biophys.* 326(1): 21–30.
- Six, D. A., and Dennis, E. A. (2000). *Biochim. Biophys. Acta.* 1488(1–2):1–19, Review.
- Smolka, M. B., Zhou, H., Purkayastha, S., and Aebersold, R. (2001). *Anal. Biochem.* 297(1), 25–31.
- Smolka, M. B., Marangoni, S., Oliveira, B., and Novello, J. C. (1998). *Toxicon* 36(7), 1059–1063.
- Soares, A. M., Rodrigues, V. M., Homsí-Brandeburgo, M. I., Toyama, M. H., Lombardi, F. R., Arni, R. K., and Giglio, J. R. (1998). *Toxicon* 36: 503–514.
- Toyama, M. H., Mancuso, L. C., Giglio, J. R., Novello, J. C., Oliveira, B., and Marangoni, S. (1995). *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37(6), 1047–1055.
- Tsai, I. H., Chen, Y. H., Wang, Y. M., Liao, M. Y., and Lu, P. J., (2001). *Arch. Biochem. Biophys.* 387: 257–264.
- Tsai, I. H., Wang, Y. M., Au, L. C., Ko, T. P., Chen, Y. H., and Chu, Y. F. (2000). *Eur. J. Biochem.* 267: 6684–6691.
- Valentin, E., and Lambeau, G. (2000). *Biochimie* 82: 815–31, Review.
- Warrell, D. A., Looareesuwan, S., Theakston, R. D., Phillips, R. E., Chanthavanich, P., Viravan, C., Supanaranond, W., Karbwang, J., Ho, M., and Hutton, R. A. (1986). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35(6), 1235–1247.
- World Health Organization, Progress in the Characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms, WHO offset publication No. 58, (1981) Geneva.
- Yamaguchi, Y., Shimohigashi, Y., Chiwata, T., Tani, A., Chijiwa, T., Lomonte, B., and Ohno, M. (1997). *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43(1), 19–26.
- Yamakawa, M., Nozaki, M., and Hokama, Z. (1976) *Edis. Animal Plant and Microbial Toxins.* New York: Plenum Press 97–109.



## Structural and functional characterization of myotoxin, Cr-IV 1, a phospholipase A<sub>2</sub> D49 from the venom of the snake *Calloselasma rhodostoma*

V.L. Bonfim<sup>a,\*</sup>, L.A. Ponce-Soto<sup>a</sup>, D. Martins de Souza<sup>a</sup>, G.H.M.F. Souza<sup>b</sup>, P.A. Baldasso<sup>a</sup>, M.N. Eberlin<sup>b</sup>, S. Marangoni<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas, P.O. Box 6109, Zip Code 13083 970, Campinas, SP, Brazil

<sup>b</sup> Thomson Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, State University of Campinas, P.O. Box 6109, Zip Code 13083 970, Campinas, SP, Brazil

Received 16 May 2007; revised 24 October 2007; accepted 25 October 2007

### Abstract

A new D49 PLA<sub>2</sub> was purified from the venom of *Calloselasma rhodostoma* after two chromatographic steps. Molecular exclusion chromatography was done through a Protein-Pack 300 SW column (0.78 cm × 30 cm), eluting with 0.25 M ammonium bicarbonate, pH 7.9, at a flow rate of 0.3 ml/min. Reverse-phase HPLC was then performed on μ-Bondapak C-18. The sample was determined to have a molecular mass of 13,870.94 Da MALDI-TOF by mass spectrometry, and the amino acid composition showed that Cr-IV 1 presented a high content of Lys, Tyr, Gly, Pro, and 14 half-Cys residues, typical of a basic PLA<sub>2</sub>. Cr-IV 1 presented a sequence of 122 amino acid residues: DLWFGQMILKETGSLFPFY YTYGCGYCGV GRRGGKPKDA TDRCCFVHDC CYGKLTGCPK TNDRYYSRL DYTIVCGEGG PCKQICECDK AAAVCFRENL RTYNKKYRYHLKPFCKEPAE TC and a calculated pI value of 8.0. Cr-IV 1 had PLA<sub>2</sub> activity in the presence of a synthetic chromogenic substrate (4-nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid) and showed a rapid cytolytic effect on mouse skeletal muscle myoblasts and myotubes in culture. In mice, Cr-IV 1 induced myonecrosis and edema upon intramuscular and intravenous injections, respectively. The LD<sub>50</sub> of Cr-IV 1 was determined to be 0.07 mg/kg body weight by intracerebroventricular (i.c.v.) injection. The combination of structural and functional information obtained herein classifies Cr-IV 1 as a new member of the D49 PLA<sub>2</sub> family, as it presents the typical behavior of a phospholipase A<sub>2</sub> from this family.

© 2007 The International Association for Biologicals. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Phospholipase A<sub>2</sub>; Snake venom; *Calloselasma rhodostoma*; Myotoxin; Structural and functional characterization

### 1. Introduction

*Calloselasma rhodostoma* is the most common biting snake in Southeast Asia, and the rate of snakebite and envenomization in this region is the highest in the world [1]. In Malaysia, bites were mainly due to four species of land snakes: *C. rhodostoma* (Malayan pit viper), *Naja naja* (Asian common

cobra), *Trimeresurus purpureomaculatus* (shore pit viper) and *Trimeresurus wagleri* (Wagler's pit viper). ([www.tanngethong.com/index.htm](http://www.tanngethong.com/index.htm)). The *C. rhodostoma* venom is a mixture of enzymes and non-enzymatic proteins, one of them being PLA<sub>2</sub>, the focus of this study [1].

The phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) [EC 3.1.1.4] belong to a large family of enzymes that hydrolyze the sn-2 ester bond of phospholipids to liberate free fatty acids and lysophospholipids [2]. PLA<sub>2</sub> has been classified into I–XII groups according to several criteria such as amino acid sequence similarity, disulfide bond patterns, tissue specificity, cellular function and active splice variants [3]. Group II of PLA<sub>2</sub> is

\* Corresponding author. Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, Zip Code 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Fax: +55 19 3788 7840.

E-mail address: veralb@yahoo.com (V.L. Bonfim).

composed of secretory enzymes that include components of viperidae snake venoms and mammalian secretory enzymes.

PLA<sub>2s</sub> from snake venom display a variety of activities including neurotoxicity, myotoxicity, cardiotoxicity and hemolysis, and these activities that may be modulated by the specific receptors located on target cells [4,5,2]. Indeed, M- and N-type [6] PLA<sub>2</sub> receptors have been identified in many kinds of cells, including vascular smooth muscle cells, platelets, neutrophils, chondrocytes, fibroblasts, hepatocytes and mesangial cells, as well as in brain, lung and skeletal muscle [7,8]. PLA<sub>2</sub> from snake venom can bind to M receptors, which are the most common type of receptors found on human macrophages and muscle cells. These receptors may mediate some of the deleterious actions of venom PLA<sub>2s</sub>, although this has not been conclusively demonstrated. We do not seek to demonstrate that the M-type PLA<sub>2</sub> receptor plays a role in the pharmacological activities of venom PLA<sub>2</sub>; rather, we seek to show that this receptor is important to some PLA<sub>2</sub> anchorage and can have a role in measuring the deleterious effects of such proteins [9,5].

The increasing amount of endogenous secretory PLA<sub>2</sub> identified in mammalian tissues and the versatility of PLA<sub>2</sub> receptors suggest that many of the biological roles of different secretory PLA<sub>2</sub> molecules have not yet been discovered. The neurotoxic effect of the secretory PLA<sub>2</sub> from snake venom seems to be dependent on the interaction between the PLA<sub>2</sub> and a specific receptor in the nerve. Several studies have been carried out to investigate the molecular basis of this event, but despite numerous efforts, this mechanism is still unclear.

The variety of pharmacological roles for these receptors is derived from an accelerated micro-evolutionary process through which a high amino acid substitution rate has been taking place in molecular regions located primarily at the surface of these molecules [10,11].

In this work, we aim to characterize this new member of the D49 PLA<sub>2</sub> family through the determination of the primary structure of Cr-IV 1 and also the study of its various toxic activities, including cytotoxicity, myotoxicity and inflammation. Characterization of the components of snake venoms such as PLA<sub>2</sub> can lead the way to an understanding of the site and mechanism of venom action, leading to adequate treatment for envenomization patients.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Whole venom and reagents

Venom collected from adult specimens of *C. rhodostoma* was purchased from Kentucky Reptile Zoo (USA). All chemicals and reagents used in this work were of analytical or sequencing grade.

### 2.2. Molecular exclusion HPLC

*C. rhodostoma* venom (20 mg) was loaded onto a Protein-Pack 300 SW column (0.78 cm × 30 cm) and eluted with

0.25 M ammonium bicarbonate, pH 7.9, at a flow rate of 0.3 ml/min. The elution profile was monitored at 280 nm using a Waters UV/visible detector model 490 and fractions were collected using a Foxy 200 automatic fraction collector. The chromatographic runs were recorded using a Waters recorder model 746 data module-dual channel integrator. The fraction corresponding to Cr-IV was lyophilized and stored at 20 °C for later purification by reverse-phase HPLC.

### 2.3. Reverse-phase HPLC

The purification of the fraction Cr-IV, with activity PLA<sub>2</sub>, from *C. rhodostoma* obtained by HPLC molecular exclusion was done as described in Ref. [17]. Five milligrams of the PLA<sub>2</sub> fraction, Cr-IV, was dissolved in 250 ml of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (solvent A). The resulting solution was clarified by centrifugation, and the supernatant was then applied to a  $\mu$ -Bondapak C-18 column (0.78 cm × 30 cm; Waters 991-PDA system). Protein was eluted with a linear gradient (0–100%) of 66.5% (v/v) acetonitrile in 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (solvent B), at a flow rate of 2.0 ml/min. The elution profile was monitored at 280 nm and the fraction was collected, lyophilized and stored at 20 °C. The purified protein obtained was referred as Cr-IV 1.

### 2.4. Electrophoresis (SDS-PAGE)

The relative molecular mass of the protein Cr-IV 1 was determined by SDS-PAGE [12]. The molecular mass markers were (in kDa): phospholipase B – 94, albumin – 67, ovalbumin – 43, carbonic anhydrase – 30, soybean trypsin inhibitor – 20 and lysozyme – 14. Protein was visualized using Coomassie blue staining.

### 2.5. MALDI-TOF mass spectrometric (MS) analysis

The molecular mass of Cr-IV 1 PLA<sub>2</sub> fraction was analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry using a Voyager-DE PRO MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). One microlitre of sample on TFA 0.1% was mixed with 2  $\mu$ l of the matrix sinapinic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid). The matrix was prepared with 30% acetonitrile and 0.1% v/v TFA and its mass was analyzed under the following conditions: accelerate voltage 25 kV, laser fixed in 2890  $\mu$ J/com<sup>2</sup>, delay 300 ns, and in linear mode analysis [13].

### 2.6. PLA<sub>2</sub> activity

PLA<sub>2</sub> activity was measured using the assay as described in Refs. [14,15], modified for 96-well plates [16]. The standard assay mixture contained 200  $\mu$ l of buffer (10 mM Tris–HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, pH 8.0), 20  $\mu$ l of substrate (4-nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid), 20  $\mu$ l of water and 20  $\mu$ l of PLA<sub>2</sub> in a final volume of 260  $\mu$ l. After the addition of PLA<sub>2</sub> (20  $\mu$ g), the mixture was incubated for up to 40 min at 37 °C, with the absorbance being read at 10-min intervals.

The enzyme activity, expressed as the initial velocity of the reaction ( $V_0$ ), was calculated based on the increase in absorbance after 20 min. All assays were done in triplicate and the absorbances at 425 nm were measured using a SpectraMax 340 multiwell plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### 2.7. Sequencing procedure

Two milligrams of the purified protein was dissolved in 200  $\mu$ l of a 6 mol/l guanidine chloride solution (Merck, Darmstadt, Germany) containing 0.4 mol/l of Tris-HCl and 2 mmol/l EDTA (pH 8.15). Nitrogen was blown over the top of the protein solution for 15 min. It was then reduced with DTT (6 M, 200  $\mu$ l) and carboxymethylated with 14C-iodoacetic acid and icy iodoacetic acid. Nitrogen was again blown over the surface of the solution and the reaction tube was sealed. This solution was incubated in the dark at 37 °C for 1 h and desalted using a Sephadex G25 column (0.7 cm  $\times$  12 cm) with 1 mol/l acetic acid buffer. The reduced carboxymethylated PLA<sub>2</sub> (RC-PLA<sub>2</sub>) protein was digested with *Staphylococcus aureus* protease SV8 for 16 h at 37 °C using a 1:30 enzyme to substrate molar ratio, and the reaction was stopped by lyophilization. The RC-PLA<sub>2</sub> was also digested with clostripain for 8 h at 37 °C and then lyophilized again. The digested products of these treatments were fractionated by reverse-phase HPLC using a Waters PDA 991 system and a  $\mu$ -Bondapak C-18 column. The elution of peptide peaks was performed using a linear gradient consisting of 0–100% of acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid (v/v). The sequencing of the N-terminal was conducted for the RC-PLA<sub>2</sub> protein, using a Procise automatic sequencer. The phenylthioindantoin (PTH) amino acids were identified by comparing their retention times with the 20 PTH amino acid standards. Peptides containing 14C-CM-Cys were monitored by detecting the radioactivity label using a liquid scintillation counter (Beckman model L-8 250). The primary structure of the PLA<sub>2</sub> D49 Cr-IV 1 was mainly determined based on the purified peptides from the protein digested, protease SV8 and clostripain [17].

### 2.8. Amino acid analysis

Amino acid analysis was done on a Pico-Tag amino acid analyzer (Waters Systems) as described in Ref. [18]. The purified sample (30  $\mu$ g) was hydrolyzed at 105 °C for 24 h, in 6 M HCl acid (Pierce sequencing grade) containing 1% phenol (w/v).

The hydrolysates were reacted with 20  $\mu$ l of derivatization solution (ethanol:triethylamine:water:phenylisothiocyanate, 7:1:1:1, v/v) for 1 h at room temperature, after which the PTC-amino acids were identified and quantified by HPLC by comparing their retention times and peak areas with those from a standard amino acid mixture.

### 2.9. Cytotoxic activity

Cytotoxic activity was assayed on murine skeletal muscle C2C12 myoblasts (ATCC CRL-1772) as described in Ref. [19]. Variable amounts of toxin were diluted in assay medium (Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 1% fetal calf serum) and added to cells in 96-well plates, in 150  $\mu$ l per well. Controls for 0 and 100% toxicity consisted of assay medium and 0.1% Triton X-100, respectively. After 3 h at 37 °C, a supernatant aliquot was collected for the determination of lactic dehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.27) activity from damaged cells, using a colorimetric end-point assay (Sigma 500C). Experiments were carried out in triplicate.

### 2.10. Myotoxic activity

Groups of four mice (18–20 g body weight) received an intramuscular (i.m.) and an intravenous (i.v.) injection of variable amounts of toxin dissolved in 50  $\mu$ l of PBS, in the gastrocnemius. A controlled group received 50  $\mu$ l of PBS. At different intervals of time, blood from the tail was collected into heparinized capillary tubes and the plasma was removed for measurement of the creatine kinase activity (CK; EC 2.7.3.2); this activity was determined by a kinetic assay (Sigma 47-UV). Activity was expressed in U/l, each unit defined as the phosphorylation of 1 mmol of creatine/min at 25 °C.

### 2.11. Edema-forming activity

Groups of four mice (18–20 g) received a subcutaneous (s.c.) injection of 5  $\mu$ g Cr-IV 1, in 50  $\mu$ l of PBS, into the right footpad. The left footpad received 50  $\mu$ l of PBS, as a control. After 3 h, mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation, and both feet were cut off and weighed [20]. Edema was expressed as the percent increase in weight of the right foot, as compared to the left one, and the minimum edema-forming dose (MED) was defined as the toxin dose inducing 30% edema.

### 2.12. Intracerebroventricular lethal activity

Different doses of toxin dissolved, in 10 ml PBS, were injected by intracerebroventricular (i.c.v.) route in groups of four mice (18–20 g) under light ether anesthesia, using a Hamilton microsyringe [21]. A control group received a PBS injection. Deaths were recorded after 24 h, and the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) was estimated by Spearman-Kärber method [22].

### 2.13. Statistical analysis

The results were reported as means  $\pm$  SEM. The significance of differences among means was assessed by analysis of variance followed by Dunnett's test when several experimental groups were compared with the control group. The confidence limit for significance was 5%.

### 3. Results

#### 3.1. Isolation and purification of Cr-IV 1 PLA<sub>2</sub>

The elution profile of *C. rhodostoma* venom on Protein-Pack SW 300 showed seven main peaks corresponding to Cr-I–Cr-VII (Fig. 1). Peaks Cr-III and Cr-IV showed phospholipase A<sub>2</sub> activity. Re-chromatography of fraction Cr-III by reverse-phase (RP) HPLC produced three peaks, named as Cr-III 1, Cr-III 2 and Cr-III 3 (data not shown), which were identified as (CRV-H1E6), (CRV-S1E6a) and (CRV-S1E6b), respectively [23]. Re-chromatography of the Cr-IV fraction produced two peaks, designated as Cr-IV 1 and Cr-IV 2 (CRV-K49) [23], the Cr-IV 1 fraction being responsible for the PLA<sub>2</sub> activity. As this protein has not yet been described in the literature, it is the target of this study (Fig. 2).

The purity of Cr-IV 1 and Cr-IV 2 (CRV-K49) [23] was assessed by reverse-phase HPLC on a  $\mu$ -Bondapak C-18 column (0.78 cm  $\times$  30 cm; Waters 991-PDA system). As shown in Fig. 2, each of these proteins was eluted as a single peak showing a high level of molecular homogeneity (95%).

SDS-PAGE showed that Cr-IV 1 presented a unique band with a molecular mass of 14 kDa (Fig. 3a). MALDI-TOF mass spectrometry confirmed the purity of Cr-IV 1 and showed that this protein had a molecular mass of 14,029 Da (Fig. 3b). The isoelectric point (*pI*) was theoretically calculated on the basis of its deduced amino acid sequence, yielding a value of 8.55.

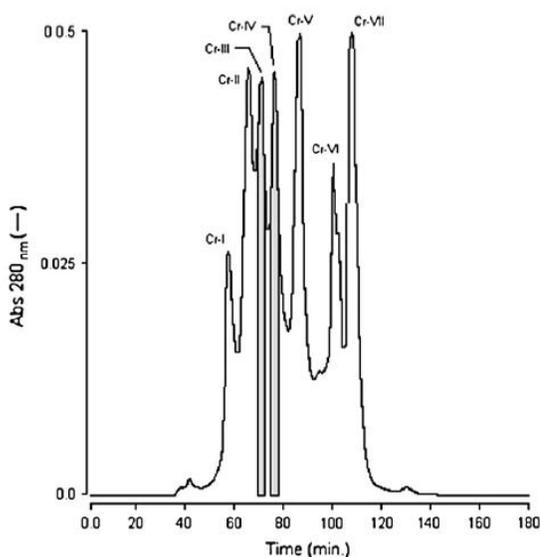


Fig. 1. Molecular exclusion chromatography of *Calloselasma rhodostoma* venom on a Protein-Pack 300 SW column (0.78 cm  $\times$  30 cm), eluted with 0.25 M ammonium bicarbonate, pH 7.9, at a flow rate of 0.3 ml/min. The elution profile was monitored at 280 nm and the main fractions obtained are identified as Cr-I–Cr-VII. The fraction containing PLA<sub>2</sub> activity (Cr-IV) was pooled, lyophilized and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

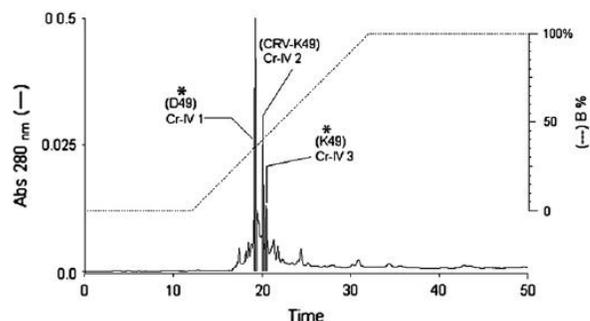


Fig. 2. Re-chromatography on RP-HPLC chromatography of the Cr-IV from *Calloselasma rhodostoma* venom on  $\mu$ -Bondapak C-18 column (0.78 cm  $\times$  30 cm); Waters 991-PDA system Waters. The elution profile was monitored at A280 nm and two fractions were obtained, Cr-IV 1 (D49) (described herein) and Cr-IV 2 (CRV-K49).

#### 3.2. PLA<sub>2</sub> activity of Cr-IV-1

The PLA<sub>2</sub> activity of Cr-IV 1 was examined using the synthetic chromogenic substrate 4-nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid [24]. The PLA<sub>2</sub> activity of the purified protein was higher than that of the total venom (Cr Total), which was  $7.43 \pm 0.23$  nmol/mg/min. Cr-III was  $0.89 \pm 0.13$  nmol/mg/min, Cr-IV was  $9.98 \pm 0.39$  nmol/mg/min and Cr-IV 1 was  $14.25 \pm 0.36$  nmol/mg/min (Fig. 4).

#### 3.3. Determination of amino acid sequences of the Cr-IV 1 PLA<sub>2</sub>

Reverse-phase HPLC of the peptide mixture obtained by digestion of Cr-IV 1 with *clostripain* revealed the presence of 16 peptides for Cr-IV 1 PLA<sub>2</sub>, and digestion with the protease SV8 resulted in nine peptides for Cr-IV 1 PLA<sub>2</sub> (data not shown). The primary structure of Cr-IV 1 was determined by comparing the sequences of the overlapping peptides purified from the above digests. Although various peptides have been purified and sequenced, only six (Clt-3, Clt-7, Clt-9, SV8-2, SV8-4 and SV8-6) were important in determining the primary structure of Cr-IV 1.

Cr-IV 1 is composed of 122 amino acid residues, showing high sequence homology among themselves and 72–79.3% of amino acid identity in the region associated with catalytic site (Fig. 5).

#### 3.4. Biological activities of the Cr-IV 1 PLA<sub>2</sub>

*In vitro*, the Cr-IV 1 rapidly lysed skeletal muscle C2C12 cell line with a dose of 40  $\mu\text{g}/\text{well}$  (40  $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$ ), causing 91.50% and 88.40% cytotoxicity in myoblasts and myotubes, respectively (Fig. 6).

*In vivo*, the Cr-IV 1 induced a conspicuous myotoxic local but not systemic effect, evidenced by the rapid and dose-dependent elevation of plasma CK activity, which reached a maximum 2 h after injection, and returned to normal levels after 24 h (Fig. 7).

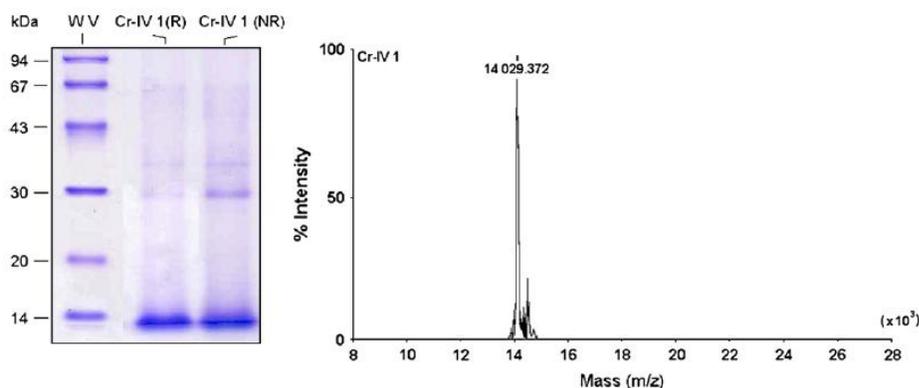


Fig. 3. Tricine SDS-PAGE profile of non-reduced (NR) and reduced (R) Cr-IV 1. kDa: molecular mass markers ( $\times 10^{-3}$ ). Mass of Cr-IV 1 determined by MALDI-TOF mass spectrometry.

The toxin also induced moderate footpad edema at 3 h, with an MED of  $45 \pm 37 \mu\text{g}$  (Fig. 8) evidencing the local increase in vascular permeability.

### 3.5. Intracerebroventricular lethal activity

The Cr-IV 1 lethal activity by the i.c.v. route was low, with an estimated LD<sub>50</sub> value of 0.07 mg for a 18–20 g mouse ( $\sim 0.07 \text{ mg/kg}$  body weight).

## 4. Discussion

Injuries caused by *C. rhodostoma* are of great importance in Thailand and Malaysia due to the high incidence of snake-bites [25], so it is of interest to characterize the venom components involved in envenom that cause so many health problems, primarily in rural workers. PLA<sub>2</sub> is one of these components, and this venom shows moderate PLA<sub>2</sub> levels. Even though the PLA<sub>2</sub> analyzed was derived from different sources, three regions in these proteins from class I and II

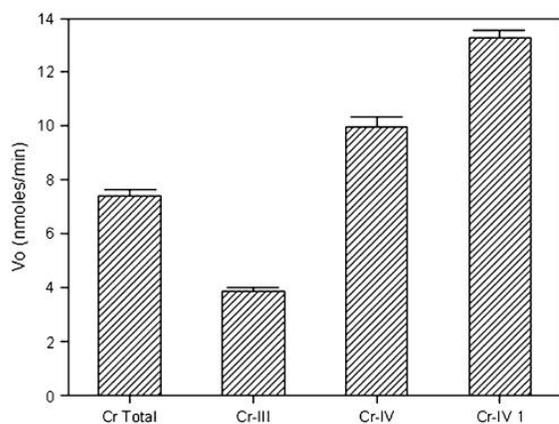


Fig. 4. PLA<sub>2</sub> activity of *Calloselasma rhodostoma* total venom (25  $\mu\text{g/ml}$ ), Cr-III (25  $\mu\text{g/ml}$ ), Cr-IV (25  $\mu\text{g/ml}$ ) and Cr-IV 1 (25  $\mu\text{g/ml}$ ).

present a high degree of homology. These regions contribute to the formation of highly conserved secondary and tertiary structural elements, including the N-terminal helix (residue 12), calcium binding (residues 25–33) and active site regions together with the amino acids forming the “hydrophobic channel” which binds the fattyacyl chains of the phospholipid. The regions displaying a lower degree of amino acid homology correspond to less conserved structural elements and are likely determinants of the diverse pharmacology effects exhibited by venom PLA<sub>2s</sub> [26].

In addition to their contribution to the hydrophobic core, amino acids in the N-terminal helix play a further role in catalysis, and consequently the modification of residues at the -NH terminus reduces enzymatic activity [27]. The high homology in the conserved domains responsible for the catalytic activity of PLA<sub>2</sub> allows for the conformational maintenance of the hydrophobic cavity at the N-terminal region. This cavity permits lipidic substrate to gain access to the PLA<sub>2</sub> catalytic site.

In the active PLA<sub>2</sub>, there is a conserved triplet that contributes to the formation of this hydrophobic wall: F5, A93 and F96 [28]. The level of identity between D49 PLA<sub>2</sub> is very high in the Ca<sup>2+</sup>-loop sequence (residues 24–34 YGCXCG XGGRG) and in the active site (residues 42–54 DRCCFVH DCCYXK) [28]. The amino acid sequence of Cr-IV 1 shows that these regions are highly conserved and directly linked in the catalyses (Fig. 5).

The major structural feature of the class I/II enzymes is a platform defined by two long antiparallel disulphide linked  $\alpha$ -helices (helices 2 and 3, residues 37–54 and 90–109). Although these two  $\alpha$ -helices do not display a clear amphipathic character, the hydrophilic amino acid side chains are generally exposed to the solvent and the hydrophobic residues point into the protein core. Crucial exceptions include the amino acids forming the catalytic network, which are conserved in Cr-IV 1 and located on these two helices (Fig. 4).

Some authors [2,4,29–33] have proposed several models to explain PLA<sub>2</sub> catalytic and pharmacological activities. In these models, PLA<sub>2</sub> has two separated sites: one responsible

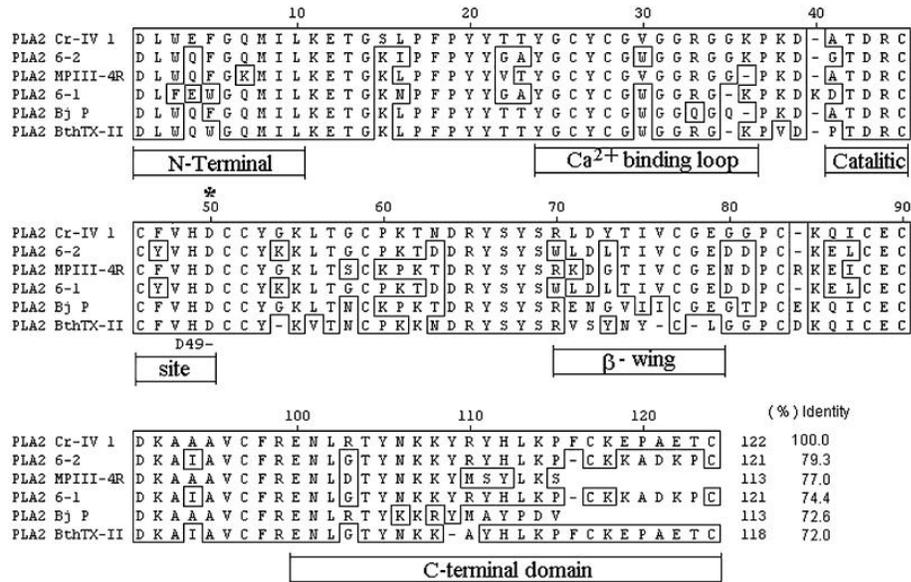


Fig. 5. The amino acid sequence alignment of Cr-IV 1 with selected PLA<sub>2</sub> sequences obtained from the BLAST protein data bank (PubMed–Medline). 6-2 PLA<sub>2</sub> D49 from *Bothrops jararacussu* [17], PLA<sub>2</sub> MPIII-4R from *Bothrops pirajai* [37], 6-1 PLA<sub>2</sub> D49 from *B. jararacussu* [17], PLA<sub>2</sub>B<sub>j</sub>p from *B. jararacussu* [38] and BthTx-II bothrotoxin II from *B. jararacussu* [39].

for catalytic activity, and the other for the expression of biological activity. According to this literature, the pharmacological site would be located at the surface of PLA<sub>2</sub> molecules. Following the model proposed in Ref. [31], the anti-coagulant site would be located in a region between the 53rd and 76th residues, designating this positively charged region in the PLA<sub>2</sub> molecule as a hallmark of high anti-coagulant activity. In PLA<sub>2</sub> with moderate or low anti-coagulant activity, there is a predominance of negative charge. This region is found in a different site than what was predicted for the neurotoxic and myotoxic effects. For example, the position K53 in

Cr-IV 1 is substituted by a residue of Gly, indicating that this protein would present a moderate anti-coagulant activity as a result of this substitution (data not shown). The determination of the primary structure of a protein is extremely important in many investigation fields such as biotechnology and medicine, since these data make it easy to understand the protein's function and its possible implications in some disease mechanisms, as well as help in the development of substances to alter the biological activity of this protein.

A profile of toxic activities was investigated for Cr-IV 1 from *C. rhodostoma*. Its studied effects include *in vivo*

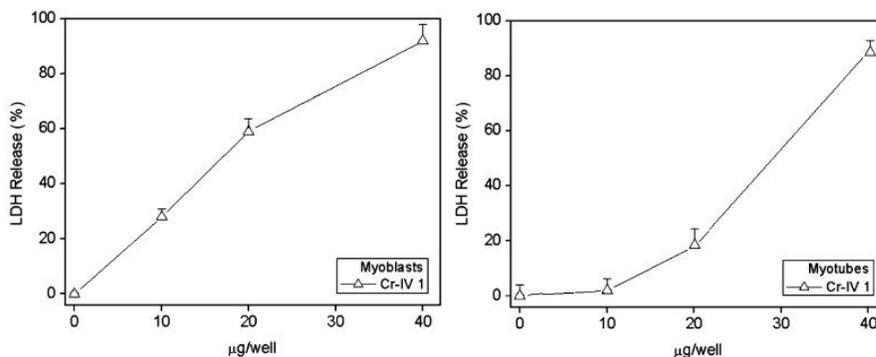


Fig. 6. Local and systemic myotoxicity activities of Cr-IV 1 in mice. Groups of four male Swiss mice (18–20 g) were injected in the right gastrocnemius muscle to induce local myotoxicity and other groups injected via i.v. injection to induce systemic myotoxicity. Twenty micrograms of Cr-IV 1 in 50 µl of PBS was used and a controlled group received 50 µl of PBS. The activity of creatine kinase (CK) was then determined using 5 µl of plasma, which was incubated for 3 min at 37 °C with 1.0 ml of the reagent according to the kinetic CK-UV protocol from Sigma Chemical Co. The activity was expressed in units/liter (U/l), each unit defined as the phosphorylation of 1 µmol of creatine/min at 37 °C.

Please cite this article in press as: Bonfim VL et al., Structural and functional characterization of myotoxin, Cr-IV 1, a phospholipase A<sub>2</sub> D49 from the venom of the snake *Calloselasma rhodostoma*, *Biologicals* (2007), doi:10.1016/j.biologicals.2007.10.004

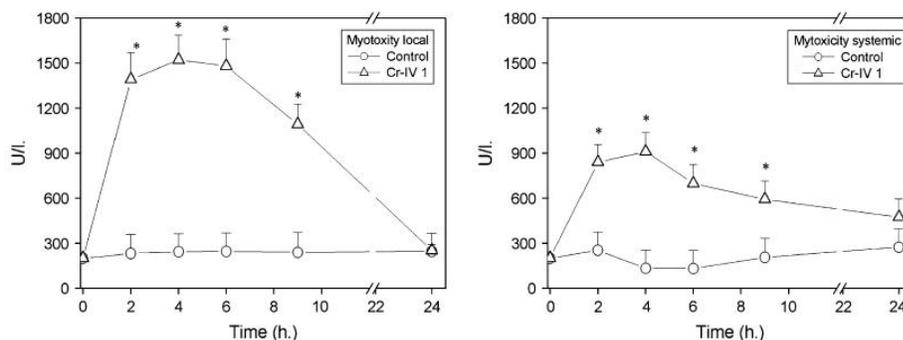


Fig. 7. Cytotoxicity of Cr-IV 1 in murine C2C12 skeletal muscle myoblasts. Cytotoxicity (cytolysis) was estimated by the release of lactic dehydrogenase (LDH) into the culture medium after a 3-h exposure to Cr-IV 1. Controls for 0 and 100% toxicity consisted of assay medium and 0.1% Triton X-100, respectively. Each point represents the mean  $\pm$  SD of triplicate cell cultures.

myotoxicity correlating with the ability of this Cr-IV 1 to lyse cultures of myoblasts, which is a proposed model for the study of snake venom group II PLA<sub>2s</sub> [19]. In addition to *in vivo* myotoxicity, Cr-IV 1 induced cytotoxicity on myoblasts in culture and footpad edema in mice. These activities have been previously described for other D49 PLA<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* [33].

Local and systemic skeletal muscle degeneration is a common consequence of envenomations due to snakebites and mass bee attacks. PLA<sub>2</sub> is an important myotoxic component in these venoms, inducing a similar pattern of degenerative events in muscle cells. The Cr-IV 1 showed similar behavior to other PLA<sub>2</sub> D49 (Fig. 7), exhibiting almost 100% cytotoxicity in a dosage of 40  $\mu$ g/ml and evidencing expected cytotoxic activity by PLA<sub>2</sub> of group II.

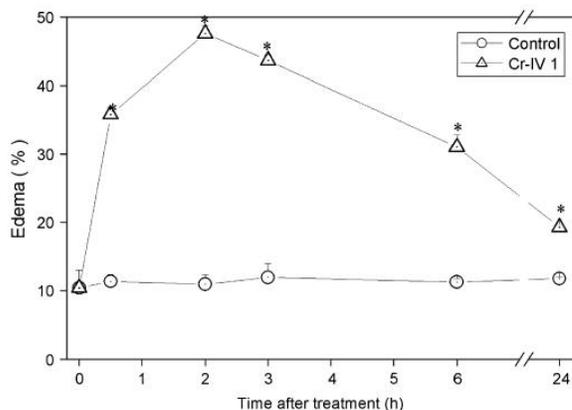


Fig. 8. Inflammatory activities of Cr-IV 1 from *Calloselasma rhodostoma* in mice. Induction of edema by Cr-IV 1. Groups of four mice (18–20 g) were injected in the subplantar region with a dose of 5  $\mu$ g/50  $\mu$ l of PBS into right footpad. The left footpad received 50  $\mu$ l of PBS, as a control. After 0.5, 2, 3, 6 and 24 h, mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation, and both feet were cut off and weighed [20]. Edema was expressed as the percent increase in weight of the right foot, as compared to the left. Each point represents the mean  $\pm$  SD of four animals.

The botropics PLA<sub>2</sub> myotoxins generally have low systemic toxicity, in contrast to strongly neurotoxic and myotoxic PLA<sub>2</sub> [34]. Our studies on local and systemic myotoxicity *in vivo* reveal that Cr-IV 1 is a myotoxin with local but not systemic action, due to the decrease in the plasmatic CK levels when the Cr-IV 1 is administered by intravenous route in mice. This fact reinforces the hypothesis of differentiated local and systemic myotoxic action proposed in Ref. [5] and also the specific and non-specific activities proposed in Ref. [2]. Catalytically active PLA<sub>2</sub> plays a role in the occurrence of edematogenic effects.

However, some catalytically inactive PLA<sub>2s</sub> are also able to induce edema, suggesting that the hydrolysis of phospholipids is not primordial for this effect, thereby supporting the idea of different mechanisms for catalytic and pharmacological activities as suggested in Ref. [4]. Lys-49 and Asp-49 have been shown to induce footpad edema *in vivo* and *in vitro*; nevertheless such effects are reduced by the catalytic inhibitor BPB [35,36]. This inhibitor also reduces the footpad edema stimulated by myotoxin III, an Asp-49 PLA<sub>2</sub> from *Bothrops asper* venom [37]. Thus, according to the literature, some catalytically active PLA<sub>2s</sub> play a role in the edematogenic effect. The Cr-IV 1, the D49 PLA<sub>2</sub> studied here, confirms these suggestions since it has induced edema in mice.

Therefore, PLA<sub>2</sub> shows pharmacological sites as well as catalytic ones, but both contribute to the pharmacological and pro-inflammatory effects induced by such proteins PLA<sub>2</sub> [38].

Lethal dose (LD<sub>50</sub>) is the chemical dose that is able to kill 50% of a sample population. Such values are widely reported and used as an effective measure of the potential toxicity of chemicals. A higher lethal dose indicates a lower toxicity for the chemical/protein analyzed. The Cr-IV 1 evidenced a lethal dose (LD<sub>50</sub>) estimated to be 0.070 mg/kg by i.c.v. route, and this potency is very low compared with other PLA<sub>2</sub> D49 [39], suggesting that its enzymatic activity may drastically enhance the lethal action of these proteins. This pathway is used to discharge pharmacological agents to the central nervous system in order to surpass the hematoencephalic barrier or decrease the direct systemic effects.

The purification of this new D49 PLA<sub>2</sub> (Cr-IV 1), found in a known venom, gives an example of how to obtain a better chromatographic profile and, consequently, a better understanding of the biological behavior of the studied venom. We have proposed a new methodology to purify this venom and it has proven to be greatly satisfactory, since it has evidenced the presence of a new PLA<sub>2</sub> D49. The biochemical characterization and its relation to the biological effects studied herein show that Cr-IV 1 is a new PLA<sub>2</sub> of the Asp-49 (D49) family, since it acts similarly to a member of this protein family.

### Acknowledgments

This paper was supported by Capes (Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) and is part of a PhD thesis by Vera Lucia Bonfim.

### References

- [1] Warrel DA, Looreesuan S, Theakston RD, Phillips RE, Chanthavanich P, Viravan C, et al. Randomized comparative trial of three monospecific antivenoms for bites by the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) in southern Thailand: clinical and laboratory correlations. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35(6):1235–47.
- [2] Tan N-H, Ponnudurai G. The toxinology of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom. *J Toxicol* 1996;1–17.
- [3] Kini RM. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Toxicon* 2003;827–40.
- [4] Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 2000;1488:1–19.
- [5] Kini RM, Chan YM. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *J Mol Evol* 1999;48:125–32.
- [6] Kordis D, Gubensek F. Bov-B long interspersed repeated DNA (LINE) sequences are present in *Vipera ammodytes* phospholipase A<sub>2</sub> genes and in genomes of Viperidae snakes. *Eur J Biochem* 1997;246:772–9.
- [7] Ponce-Soto LA, Bonfim VL, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Marangoni S. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA<sub>2</sub> D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using *in vitro* neuromuscular preparation. *Protein J* 2006;25(2):147–55.
- [8] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [9] Smolka MB, Zoppi CC, Alves AA, Silveira LR, Marangoni S, Pereira-Da-Silva L, et al. Optimization of the isotope-coded affinity tag-labeling procedure for quantitative proteome analysis. *Anal Biochem* 2001;297(1):25–31.
- [10] Cho W, Kézdy FJ. Chromogenic substrates and assay of phospholipases A<sub>2</sub>. *Methods Enzymol* 1991;197:75–9.
- [11] Holzer M, Mackessy SP. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A<sub>2</sub>. *Toxicon* 1996;34:1149–55.
- [12] Ponce-Soto LA, Toyama MH, Hyslop S, Novello JC, Marangoni S. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA<sub>2</sub> from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *J Protein Chem* 2002;21:131–6.
- [13] Henrikson RL, Meredith SC. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal Biochem* 1984;136(1):65–74.
- [14] Lomonte B, Angulo Y, Rufini S, Cho W, Giglio JR, Ohno M, et al. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> on mouse endothelial (EEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. *Toxicon* 1999;37:145–58.
- [15] Yamakawa M, Nozaky M, Hokama Z. Fractionation of sakishimahabu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions. In: Ohsaka A, Hayashi K, Sawai Y, editors. *Toxins: animal, plant and microbial*. New York: Plenum Press; 1976. p. 97–109.
- [16] Gutiérrez JM, Lomonte B, Chaves F, Moreno E, Cerdas L. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comp Biochem Physiol* 1986;84C:159–64.
- [17] World Health Organization. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms, vol. 58. WHO Offset Publication; 1981. p. 23.
- [18] Tsai IH, Wang Ying-Ming, Au Lo-Chun, Ko Tzu-Ping, Chen Yi-Hsuan, Chu Yi-Fang. Phospholipases A<sub>2</sub> from *Calloselasma rhodostoma* venom gland cloning and sequencing of 10 of the cDNAs, three-dimensional modeling and chemical modification of the major isozyme. *Eur J Biochem* 2000;267:6684–91.
- [19] Brunie S, Bolin J, Gerwith D, Sigler PB. The refined crystal structure of dimeric phospholipase A<sub>2</sub> at 2.5 Å. Access to a shielded catalytic center. *J Biol Chem* 1985;260(17):9742–9.
- [20] Trishnanda M. Incidence, clinical manifestation and general management of snakebites. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1979; 10(2):248–50.
- [21] Arni RK, Ward RJ. Phospholipase A<sub>2</sub> – a structural review. *Toxicon* 1996;34:827–41 [review].
- [22] Slotboom AJ, de Haas GH. Specific transformations at the N-terminal region of phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochemistry* 1975;14(25):5394–9.
- [23] Valentin E, Lambeau G. What can venom phospholipase A(2) tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipase A(2)? *Biochimie* 2002;82:815–31 [review].
- [24] Kini RM, Iwanaga S. Structure–function relationships of phospholipases. I: prediction of presynaptic neurotoxicity. *Toxicon* 1986;24: 527–41.
- [25] Kini RM, Iwanaga S. Structure–function relationships of phospholipases. II: charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* 1986;24:895–905.
- [26] Kini RM, Evans HJ. Structure–function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 1987; 262:14402–7.
- [27] Kini RM, Evans HJ. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. *Int J Pept Protein Res* 1989;34:277–86.
- [28] Kini RM, Evans HJ. Role of cationic residues in cytolytic activity: modification of lysine residues in the cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom and correlation between cytolytic and antiplatelet activity. *Biochemistry* 1989;28:9209–15.
- [29] Bonfim VL, Ponce-Soto LA, Novello JC, Marangoni S. Cytotoxic action in myoblasts and myotubes (C2C12) and enzymatic characterization of a new phospholipase A<sub>2</sub> isoform (Bj-V) from *Bothrops jararacussu* venom. *Protein Pept Lett* 2006;13(7):707–13.
- [30] Rosenberg P. Lethal potency of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. Pitfalls to avoid in the study of correlations between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. In: Kini RM, editor. *Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: structure, function and mechanism*. New York: Wiley; 1997. p. 129–54.
- [31] Gutierrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 2003;42:915–31 [review].
- [32] Landucci EC, Castro RC, Pereira MF, Cintra AC, Giglio JR, Marangoni S, et al. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A<sub>2</sub> homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur J Pharmacol* 1998;343(2–3):257–63.
- [33] Landucci EC, de Castro RC, Toyama M, Giglio JR, Marangoni S, De Nucci G, et al. Inflammatory oedema induced by the lys-49 phospholipase A(2) homologue piratoxin-i in the rat and rabbit. Effect of polyaniions and *p*-bromophenacyl bromide. *Biochem Pharmacol* 2000;59(10):1289–94.
- [34] Chaves F, Leon G, Alvarado VH, Gutiérrez JM. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases

- A<sub>2</sub> isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 1998;36(12):1861–9.
- [35] Teixeira CF, Landucci EC, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon* 2003; 42(8):947–62 [review].
- [36] Kini RM. *Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: structure, function and mechanism*. Chichester, England: Wiley; 1997. 1–511.
- [37] Toyama MH, Costa PD, Novello JC, de Oliveira B, Giglio JR, da Cruz-Hofling MA, et al. Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA<sub>2</sub> and anticoagulant activities and high myotoxic activity. *J Protein Chem* 1999;18(3):371–8.
- [38] Moura-da-Silva AM, Paine MJ, Diniz MR, Theakston RD, Crampton JM. The molecular cloning of a phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom: evolution of venom group II phospholipase A<sub>2s</sub> may imply gene duplications. *J Mol Evol* 1995;41(2):174–9.
- [39] Pereira MF, Novello JC, Cintra AC, Giglio JR, Landucci ET, Oliveira B, et al. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (*Jararacucu*) venom with low phospholipase A<sub>2</sub> activity. *J Protein Chem* 1998;17(4):381–6.

## 6. Conclusões:

Como discutido ao longo do trabalho, várias tentativas têm sido feitas no intuito de se conhecer as bases moleculares para o funcionamento das PLA<sub>2</sub>, e também das PLA<sub>2</sub> homólogas K49. São vários os autores que se dedicam a este entendimento e graças a isto temos a cada dia mais informações a respeito desta família tão interessante de proteínas.

Apesar das várias tentativas de se correlacionar seqüência e aspectos estruturais com miotoxicidade, por exemplo, desempenhadas por PLA<sub>2</sub> provenientes de serpentes, algumas são contraditórias e não mostram um quadro claro relativo às bases estruturais para a função da atividade hidrolítica e da região ou regiões responsáveis pela miotoxicidade em ambas PLA<sub>2</sub> D49 e as PLA<sub>2</sub> homólogas K49.

No entanto, apesar de uma aparente contradição, muito já se sabe a respeito e a busca por um melhor entendimento sobre estas proteínas não pode parar, pois, uma melhor compreensão poderá contribuir para o conhecimento das interações proteína-proteína, proteína-alvo e assim providenciar detalhes, celulares e moleculares, a respeito dos mecanismos dos efeitos farmacológicos e conseqüentemente, respostas para a toxicidade das enzimas PLA<sub>2</sub>.

As PLA<sub>2s</sub> aqui estudadas apresentam: forte caráter básico e independente de apresentarem atividade catalítica (PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 e Cr-IV 1) ou não (PLA<sub>2</sub> Bj-VII e Cr 5) mostram efeito miotóxico, citotóxico e capacidade de formação de edema. Este trabalho ajuda a inferir que deve haver regiões moleculares distintas da catalítica que são responsáveis pelos eventos farmacológicos apresentados tanto pelas PLA<sub>2</sub> quanto pelas PLA<sub>2</sub> homólogas K49. As comparações estruturais e as análises de filogenia entre as PLA<sub>2</sub> 6-1, 6-2 e Cr-IV 1 e as PLA<sub>2</sub> homólogas K49 Bj VII e Cr-5, revelam que se tratam de proteínas semelhantes onde a atividade catalítica é quem termina por subdividi-las em subfamílias, as D49 e as K49 (Figura 17). Assim, tanto as PLA<sub>2</sub> D49 quanto as K49 aqui estudadas pertencem ao grupo II das fosfolipases e podem, por exemplo, exercerem uma ação miotóxica através de mecanismos moleculares diferentes, em que as PLA<sub>2</sub> D49 podem não utilizar a região C-terminal como mecanismo crucial na desestabilização da membrana no efeito miotóxico local ou sistêmico, assim como em outras atividades farmacológicas estudadas neste trabalho.

Nossos resultados sobre os estudos estrutura-função das PLA<sub>2</sub> e das PLA<sub>2</sub> homólogas K49 procedentes dos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Calloselasma rhodostoma* mostram algumas diferenças estruturais ao longo da caracterização físico-química e, apesar de todas elas apresentarem algumas diferenças de tipo biológico, possuem um comportamento semelhante na estrutura-função. O que permite sugerir que todas elas procedem de um gene ancestral comum e que provavelmente ao longo do processo micro evolutivo foram sendo expressas algumas modificações nestas proteínas, dando origem à presença de isoformas com o objetivo de garantir a sobrevivência da espécie, ou seja, mesmo sendo ambas de locais geográficos diferentes, todas elas se apresentam com um mesmo padrão de comportamento.

Embora as proteínas estudadas aqui sejam semelhantes em termos de estrutura-função, a presença de variabilidade de expressão (isoformas) mostra um alto grau de adaptação destas ao meio ambiente, com o intuito de co-existirem com os outros organismos presentes no sistema biológico, cumprindo uma função no fluxo da matéria e energia.

## 7. Anexo:



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

### Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

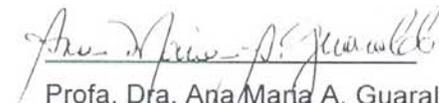
#### CERTIFICADO

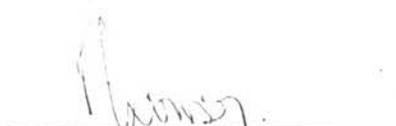
Certificamos que o Protocolo nº 1207-1, sobre "Estudos estrutura-função de fosfolipase A2D49 e K49 homólogas isoladas do veneno Bothrops jararacussu e Calloselasma rhodostoma. Análise comparativa estrutural e biológica", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Sérgio Marangoni / Vera Lucia Bonfim, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 27 de fevereiro de 2007.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1207-1, entitled " \_\_\_\_\_ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 27, 2007.

Campinas, 27 de fevereiro de 2007.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

## 8. Bibliografia

Anita, H., Hanasaki, K., Nakano, T., Oka, S., Teraoka, H and Matsumoto. Novel proliferative effect of phospholipase A<sub>2</sub> in Swiss 3T3 cells via specific binding site. 1991. J. Biol. Chem. 266, Issue 29, 19139-19141.

Araújo, M. Ofidismo. In: Pitta GBB., Castro A.A, Burihan E, editores. Angiologia e Cirurgia Vascular: 2003. guia ilustrado. Maceió: Uncisal?ECHAL & LAVA;

Arni, R.K and Ward RJ. Phospholipase A<sub>2</sub> a structural review. 1996. Toxicon. Aug;34(8):827-41. Review.

Bieber, A.L., Ziolkowski, C., d'Avis, P.A. Rattlesnake toxins alter development of muscle cells in culture. 1994. Ann N Y Acad Sci. 710:126-41.

Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. 1994. Pharmacol Ther. 62(3):325-72.

Bomalaski, J.S., Lawton, P., Browning, J.L. Human extracellular recombinant phospholipase A<sub>2</sub> induces an inflammatory response in rabbit joints. J Immunol. 1991 Jun 1;146 (11):3904-10.

Bonfim, V.L., Ponce-Soto, L.A., Martins, D., Souza, G.H.M.F., Baldasso, P.A., Eberlin, M.N., Marangoni, S. Structural and functional characterization of myotoxin, Cr-IV 1, a phospholipase A<sub>2</sub> D49 from venom of the snake *Calloselasma rhodostoma*. 2008. Biologicals. Jan 14. PMID: 18249006.

Bonfim, V.L., Ponce-Soto, L.A., Novello, J.C., Marangoni, S. Cytotoxic action in myoblasts and myotubes (C2C12) and enzymatic characterization of a new phospholipase A<sub>2</sub> isoform (Bj-V) from *Bothrops jararacussu* venom. 2006a. Protein Pept Lett. 13(7):707-13.

Bonfim V.L, Ponce-Soto LA, Novello JC, Marangoni S. Structural and functional properties of Cr 5, a new Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue isolated from the venom of the snake *Calloselasma rhodostoma*. 2006b. Protein J. Dec; 25(7-8):492-502.

Bonfim, V.L., Toyama, M.H., Novello, J.C., Hyslop, S., Oliveira, C.R., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S. 2001. J. Protein Chem 20(3):239-45. Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom.

Bragança, B and Sambray, Y.M. Multiple Forms of Cobra Venom Phospholipase A<sub>2</sub>. 1967. Nature 216: 1210 – 1211.

Cardoso, J.L., Fan, H.W., Franca, F.O., Jorge, M.T., Leite, R.P., Nishioka, S.A., Avila, A., Sano-Martins, I.S., Tomy, S.C., Santoro, M.L. Randomized comparative trial of

three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil. 1993. Q J Med;86(5):315-25.

Cardoso, J.L.C., Brando, R.B. Acidentes por animais peçonhentos. 1982. São Paulo: Editora Santos.

Chaves, F., Barboza, M., Gutiérrez, J.M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. 1995. Toxicon 33(1): 31-9.

Chaves, F., Leon, G., Alvarado, V. H., Gutierrez, J.M. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). 1998. Toxicon 36(12), 1861-9.

Chioato L, Ward RJ. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A<sub>2</sub> by sequence analysis and site directed mutagenesis. 2003. Toxicon. 42(8):869-83.

Chippaux, J.P. Snake-bites: appraisal of the global situation. 1998. Bull World Health Org; 76(5):515-24.

Cho, W and Kézdy, F.J. Chromogenic substrates and assay of phospholipases A<sub>2</sub>. 1991. Methods Enzymol 197, 75-9.

Chung, M.C.M.;Tan, N.H.; Ponnudurai, G. Structural analysis of the major haemorrhagin from *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom. 1995. Toxicon, Volume 33, Number 11, pp. 1397-1398(2).

Cintra, A. C. O., Marangoni, S., Oliveira, B., and Giglio, J. R. Bothropstoxin-I: Amino Acid Sequence and Function. 1993. J. Protein Chem. 12: 57-64.

Cury, Y and Picolo, G. Animal toxins as analgesics--an overview. 2006. Drug News Perspect. Sep;19(7):381-92. Review.

Daltry, J.C., Ponnudurai, G., Shin, C.K., Tan, N.H., Thorpe, R.S., Wüster, W. Electrophoretic profiles and biological activities: intraspecific variation in the venom of the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). 1996. Toxicon. 34(1):67-79.

Dambisya, Y.M., Lee, T.L., Gopalakrishnakone, P. Action of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom on human blood coagulation and fibrinolysis using computerized thromboelastography (CTEG). 1994. Toxicon. Dec;32(12):1619-26.

Daniele J.J., Bianco, I.D., Delgado, C., Carrillo, D.B., Fidelio, G.D. A new phospholipase A<sub>2</sub> isoform isolated from *Bothrops neuwiedii* (Yarará chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. 1997. *Toxicon*. 35(8):1205-15

De Faria L, Antunes E, Bon C, de Araújo A.L. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. 2001. *Toxicon*; 39(6):825-30.

Dennis, A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A<sub>2</sub>. 1994. *J Biol Chem*. 269(18):13057-60. Review.

Díaz, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Gené, J.A. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A<sub>2</sub>, anticoagulant and myotoxic activities. 1991. *Biochim Biophys Acta*. Dec 9; 1070(2):455-60.

Díaz, C., Alape, A., Lomonte, B., Olamendi, T., Gutiérrez, J.M. Cleavage of the NH<sub>2</sub>-terminal octapeptide of *Bothrops asper* myotoxic lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> reduces its membrane-destabilizing effect. 1994. *Arch Biochem Biophys*. 1;312(2):336-9

Díaz-Oreiro, C., Gutiérrez, J.M. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. 1997. *Toxicon*. 35(2):241-52.

Dixon, R.W and Harris, J.B. Myotoxic activity of the toxic phospholipase, notexin, from the venom of the Australian tiger snake. 1996. *J Neuropathol Exp Neurol*. 55(12):1230-7.

Ferreira, S.H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. 1965. *Br. J. Pharmacol*, 24: 163-169.

Ferreira, S.H., Rocha e Silva, M. Potentiation of Bradykinin by dimercaptopropanil (BAL) and other inhibitors of this destroying enzyme in plasma. 1962. *Biochem Pharmacol*, 11: 1123-1128.

Francis, B., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., and Kaiser, J.I. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub>. 1991. *Arch. Biochem. Biophys*. 284: (2), 352-359.

Ganziani, G., Seki, C., Vidal, J.C The mechanism of inhibition of phospholipase activity of crotoxin B by crotoxin A. 1983. *Toxicon* 21: 663–674.

Ganziani, G., Seki, C., Vidal, J.C. Accessibility of the active site of crotoxin B in the crotoxin complex. 1982. *Toxicon* 20: 809–822.

Gopalakrishnakone, P and Hawgood, B.J. Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. 1984. *Toxicon*. 22(5):791-804.

Gutiérrez, J.M and Lomonte, B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. 2003. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Malaque, C.M.S., Haddad, J.R. Eds. *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. São Paulo: Sarvier: 310-23.

Gutiérrez, J.M and Ownby, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom Phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. 2003. *Toxicon* 42, 915-931.

Gutiérrez, J.M and Rucavado, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. 2000. *Biochimie* 82: 841–850.

Gutiérrez, J.M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. 2002. *Rev. Biol. Trop.* 50: 377-394.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. 1997. In: Kini, R.M., (Ed.), *Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: structure, function, and mechanism*. Wiley, England, pp. 321-352.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. 1995. *Toxicon*. Nov; 33(11):1405-24. Review.

Gutiérrez, J.M., Ponce-Soto, L.A., Marangoni, S., Lomonte, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A<sub>2</sub>: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA<sub>2</sub> homologue. *In press*. *Toxicon*.

Harvey AL, Bradley KN, Cochran SA, Rowan EG, Pratt JA, Quillfeldt JA, Jerusalinsky DA. What can toxins tell us for drug discovery? 1998. *Toxicon*. 36(11):1635-40.

Heinrikson, R.L., Meredith S.C. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. 1984. *Anal Biochem* 136(1), 65-74.

Holzer, M., Mackessy, S. P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A<sub>2</sub>. 1996. *Toxicon* 34, 1149-1155.

Homsi-Brandeburgo, M.I., Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L., Giglio, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. 1988. *Toxicon*. 26(7):615-27.

Houmard J, Drapeau GR. Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. 1972. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 69(12):3506-9.

Incerpi S, de Vito P, Luly P, Rufini S. Effect of ammodytin L from *Vipera ammodytes* on L-6 cells from rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 1995. 31;1268(2):137-42.

Jiménez-Porras, J.M. Reptile toxins. 1973. In: *Biology Data Book Vol. 2*, Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), U.S.A. p. 697.

Jorge, M.T., Cardoso, J.L., Castro, S.C., Ribeiro, L., Franca, F.O., de Almeida, M.E., Kamiguti, A.S., Santo-Martins, I.S., Santoro, M.L., Mancau, J.E. A randomized 'blinded' comparison of two doses of antivenom in the treatment of *Bothrops* envenoming in Sao Paulo Brazil. 1995. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 89(1):111-4.

Junqueira, L.C.U e Carneiro, J. *Biologia Celular e Molecular*. Editora Guanabara Koogan. 8<sup>o</sup> edição. 2005.

Kamiguti, A.S., Hay, C.R., Theakston, R.D., Zuzel, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. 1996. *Toxicon*. 34(6):627-42. Review.

Kanashiro, M.M, de Cássia M Escocard R, Petretski, J.H., Prates, M.V., Alves, E.W., Machado, O.L. da Silva, W.D., Kipnis, T.L. Biochemical and biological properties of phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops atrox* snake venom. 2002. *Biochem Pharmacol*. 64(7):1179-86

Kato, T., Ishiwata, M., Nagai, T. Mitochondrial calcium response in human transformed lymphoblastoid cells. 2002. *Life Sci* 71, 581-590.

Kihara, H., Uchikawa, R., Hattori, S., Ohno, M. Myotoxicity and physiological effects of three *Trimeresurus flavoviridis* phospholipases A<sub>2</sub>. 1992. *Biochem Int*. 28(5):895-903.

Kini, R.M and Chan, Y.M. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. 1999. *J Mol Evol* 48, 125-32.

Kini, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. 2003. *Toxicon*. 42: 827-40.

Kini, R.M. Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function and Mechanism. 1997. Wiley, Chichester, England, 1–511.

Kini, R.M., Evans, H.J. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. 1989. Int J Pept Protein Res, 34, 277-86.

Kini, R.M., Evans, H.J. Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A<sub>2</sub>. 1987. J Biol Chem 262, 14402-7.

Kordis, D., Gubensek, F. Bov-B long interspersed repeated DNA (LINE) sequences are present in Vipera ammodytes phospholipase A<sub>2</sub> genes and in genomes of Viperidae snakes. 1997. Eur J Biochem 246, 772-9.

Kudo, I and Murakami, M. Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002. 68-69:3-58. Review.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. 1970. Nature 227, 680-685.

Landucci, E.C., Castro, R.C., Pereira, M. F., Cintra, A. C., Giglio, J. R., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., Antunes, E., De Nucci, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A<sub>2</sub> homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. 1998. Eur J Pharmacol 343(2-3), 257-63.

Landucci, E.C., de Castro, R. C., Toyama, M., Giglio, J. R., Marangoni, S., De Nucci, G., Antunes, E. Inflammatory oedema induced by the lys-49 phospholipase A(2) homologue piratoxin-i in the rat and rabbit. Effect of polyanions and p-bromophenacyl bromide. 2000. Biochem Pharmacol 59(10), 1289-94.

Lee, W.H., da Silva Giotto, M.T., Marangoni, S., Toyama, M.H., Polikarpov, I, Garratt, R.C. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A<sub>2</sub>--a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. 2001. Biochemistry. 40(1):28-36.

Lomonte, B and Gutiérrez, J. M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). 1989. Toxicon. 27(7): 725-33

Lomonte, B., Angulo, Y., Rufini, S., Cho, W., Giglio, J.R., Ohno, M., Daniele, J.J., Geoghegan, P., Gutiérrez, J.M. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. 1999. Toxicon 37, 145–158.

Lomonte, B., Angulo, Y and Calderon L. An overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. 2003. *Toxicon*. 15;42(8):885-901. Review.

Magro, A.J., Soares, A.M., Giglio, J.R., Fontes, M.R. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A(2): quaternary structure and inhibition mechanism insights. 2003. *Biochem Biophys Res Commun*. 311(3):713-20.

Maraganone, J.M., Merutka, G., Cho, W., Welches, W., Kezdy, F.J and Heinrikson, R.L. A new class of phospholipase A<sub>2</sub> with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. 1984. *J.Biol.Chem.* vol. 259, Issue 22, 13839-13843.

Marangoni S, Toyama MH, Arantes EC, Giglio JR, da Silva CA, Carneiro EM, Gonçalves AA, Oliveira B. Amino acid sequence of TsTX-V, an alpha-toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K<sup>+</sup> permeability of beta-cells from isolated rat islets of Langerhans. 1995. *Biochim Biophys Acta*. 13;1243(3):309-14.

Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. 2000. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477. 146-156

Mehrtens J.M.. *Living Snakes of the World in Color*. 1987. New York: Sterling Publishers. 480 pp. ISBN 0-8069-6460-X.

Ministério da Saúde. 2001. *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 2<sup>o</sup> ed.

Mora, Rodrigo., Valverde, Berta., Díaz, Cecília., Lomonte, Bruno and Gutierrez, J.M. A Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. 2005. *Toxicon*; 45: 651-660.

Moura-da-Silva, A.M., Paine, M.J., Diniz, M.R., Theakston, R.D and Crampton, J.M. The molecular cloning of a phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom: evolution of venom group II phospholipase A<sub>2s</sub> may imply gene duplications. 1995. *J.Mol.Evol* 41(2), 174-179.

Nishioka, S.A., Silveira, P.V.P. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. 1992. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 47. p.805-810,.

Nunes, T.B. Distribuição das serpentes peçonhentas. 1994. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 27: 662-667.

Núñez, C.E., Angulo Y and Lomonte, B. Identification of the myotoxic site of Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activity. 2001. *Toxicon*; 39: 1587–1594.

Ogawa, T., Kitajima, M., Nakashima, K., Sakaki, Y., Ohno, M. Molecular evolution of group II phospholipases A<sub>2</sub>. 1995. *J Mol Evol.* 41(6):867-77.

Ownby, C.L., Selistre de Araujo, H.S., White, S.P., Fletcher, J.E. Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins. 1999. *Toxicon.* 37(3):411-45. Review.

Páramo, L., Lomonte, B., Pizarro-Cerdá, J., Bengoechea, J.A., Gorvel, J.P., Moreno, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops asper* snake venom. Synthetic Lys49 myotoxin II-(115–129)-peptide identifies its bactericidal region. 1998. *Eur. J. Biochem.* 253: 452–461.

Pedersen, J.Z., de Arcuri, B.F., Morero, R.D., Rufini, S. Phospholipase-like myotoxins induce rapid membrane leakage of non-hydrolyzable ether-lipid liposomes. 1994. *Biochim Biophys Acta.* Feb 23; 1190(1):177-80.

Pereira, M.F., Novello, J.C., Cintra, A.C., Giglio, J.R., Landucci, E.T., Oliveira, B., and Marangoni, S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (*Jararacucu*) venom with low phospholipase A<sub>2</sub> activity. 1998. *J Protein Chem* 17(4), 381-6.

Pinho, F.M.O.; Pereira, I.D. Ofidismo. 2001. *Rev. Assoc. Méd. Brás. V.* 47(1) p. 24-29.

Polgár, J., Magnenat, E.M., Peitsch, M.C., Wells, T.N., Clemetson, K.J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M(r) phospholipases A<sub>2</sub>: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A<sub>2</sub>, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). 1996. *Biochem J.* Nov 1; 319 ( Pt 3):961-8.

Ponce-Soto, L.A., Toyama, M.H., Hyslop, S., Novello, J.C., Marangoni, S. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA<sub>2</sub> from *Crotalus durissus collilineatus* venom. 2002. *J Protein Chem* 21, 131-6.

Ponce-Soto, L. A., Bonfim, V. L., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J. C., Marangoni, S. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA<sub>2</sub> D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using in vitro neuromuscular preparation. 2006. *Protein J* 25(2), 147-55.

Ponce-Soto, L.A., Lomote, B., Gutiérrez, J.M., Novello, J.C., Marangoni, S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus* (2007a). *Biochim Biophys Acta*. Apr; 1770(4):585-93.

Ponce-Soto, L.A., Lomote, B., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J.C., Marangoni, S. Biological and structural characterization of crotoxin and new isoform of crotoxin B PLA(2) (F6a) from *Crotalus durissus collilineatus* snake venom (2007b). *Protein J*. 26(4):221-30.

Ponce-Soto, L.A., Martins, D., Novello, J.C., Marangoni, S. Structural and Biological Characterization of Two Crotamine Isoforms IV-2 and IV-3 Isolated from the *Crotalus durissus cumanensis* Venom. (2007c). *Protein J*. 26(8):533-40.

Ponce-Soto L.A, Baldasso P.A, Romero-Vargas F.F, Winck F.V, Novello J.C, Marangoni S. Biochemical, pharmacological and structural characterization of two PLA<sub>2</sub> isoforms Cdr-12 and Cdr-13 from *Crotalus durissus ruruima* snake venom. 2007d. *Protein J*. 26(1):39-49.

Rigden, D.J., Hwa, L.W., Marangoni, S., Toyama, M.H., Polikarpov, I. The structure of the D49 phospholipase A<sub>2</sub> piratoxin III from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: possible relationship to cooperative substrate binding. 2003. *Acta Crystallogr, D Biol. Crystallogr*. 59 255–262.

Rosenberg, P. Lethal potency of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. Pitfalls to avoid in the study of correlations between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. 1997. In: Kini, R.M., (Ed.), *Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, New York, pp. 129–154.

Rovira ME, Carmona E, Lomonte B. Immunoenzymatic quantitation of antibodies to *Bothrops asper* myotoxins after polyvalent antivenom administration in mice. 1992. *Braz J Med Biol Res*: 25(1):23-33.

Ruffini, S., Cesaroni, M., Balestro, N., Luly, P. Proliferative effect of ammodytin L from the venom of *Vipera ammodytes* on 208F rat fibroblasts in culture. 1996. *Biochem J*; 320: 467-472.

Salvini, T.F., Amaral, A.C., Miyabara, E.H., Turri, J.A., Danella, P.M., Selistre de Araújo, H.S. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. 2001. *Toxicon*. 39(8):1141-9.

Scott, D.L and Sigler, P.B. Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipase A<sub>2</sub>. 1994. in: C.B. Anfinsen, J.T. Edsall, F.M. Richards, D.S. Eisenberg (Eds.), *Lipoproteins, Apolipoproteins and Lipases, Advances in Protein Chemistry*, vol. 45, Academic Press, California, pp. 53– 80.

Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H., Sigler, P.B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>. 1990. *Science*. 14; 250(4987):1541-6.

Selistre de Araujo H.S., White, S.P., Ownby, C.L. cDNA cloning and sequence analysis of a lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom. 1996. *Arch Biochem Biophys*. 326(1): 21-30.

Serhan, C. N. Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. 1994. *Biochim Biophys Acta*. 1212(1):1-25. Review.

Silva, C.J., Jorge, M.T., Ribeiro, L.A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. 2003. *Toxicon*. v. 41 p. 251-255.

Singh, B.S., Armugam, A., Kini, R.M., Jeyaseelan, K. Phospholipase A<sub>2</sub> with platelet aggregation inhibitor activity from *Austrelaps superbis* venom: protein purification and cDNA cloning. 2000. *Arch. Biochem. Biophys*. 375, 289-303.

Six, D.A and Dennis, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. 2000. *Biochim Biophys Acta* 1488, 1-19. Review.

Slotboom, A.J., de Haas, G.H. Specific transformations at the N-terminal region of phospholipase A<sub>2</sub>. 1975. *Biochemistry* 14(25), 5394-9.

Smolka, M.B., Zoppi, C.C., Alves, A.A., Silveira, L.R., Marangoni, S., Pereira-Da-Silva, L., Novello, J.C., Macedo, D.V. Optimization of the isotope-coded affinity tag-labeling procedure for quantitative proteome analysis. 2001. *Anal Biochem* 297(1), 25-31.

Soares, A.M., Marcussi, S., Stábeli, R.G., França, S.C., Giglio, J.R., Ward, R.J and Arantes, E.C. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. 2003. *Biochemical and Biophysical research Communication* 302: 193-200.

Subburaju, S and Kini, M. Isolation and purification of superbins I and II from *Austrelaps superbus* (copperhead) snake venom and their anticoagulant and antiplatelet effects. 1997. *Toxicon*. 35, Issue 8: 1239-1250

Toyama, M.H., Costa, P.D., Novello, J.C., de Oliveira, B., Giglio, J.R., da Cruz-Hofling, M.A., Marangoni, S. Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase  $A_2$  from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate  $PLA_2$  and anticoagulant activities and high myotoxic activity. 1999. *J. Protein Chem* 18 (3), 371-378.

Toyama, M.H., Mancuso, L.C., Giglio, J.R., Novello, J.C., Oliveira, B and Marangoni, S. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins I and II: Two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom: N-terminal. 1995. *Biochem.Mol.Biol.Int.* 37(6): 1047-1055.

Tsai, I.H., Y—Hsuan, Chen., Ying-Ming, Wang., Ming-Yi, Liau., and Pet-Jung, Lu.. Differential Expression and Geographic Variation of the Venom Phospholipase  $A_2$  of *Calloselasma rhodostoma* and *Trimeresurus mucrosquamatus*. 2001. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 387: 257-264.

Tsai, I.H., Ying-Ming, Wang., Lo-Chun, Au., Tzu-Ping, Ko., Yi-Hsuan, Chen., Yi-Fang, Chu. Phospholipases  $A_2$  from *Calloselasma rhodostoma* venom gland cloning and sequencing of 10 of the cDNAs, three-dimensional modeling and chemical modification of the major isozyme. 2000. *Eur. J. Biochem* 267, 6684-6691.

Tu A.T. Raman spectroscopy in biology: principles and applications. 1982. New York: Wiley.

Vadas, P. and Pruzanski, W.. Biology of Disease. Role of Secretory Phospholipase  $A_2$  in the Pathobiology of Disease. 1986. *Laboratory Investigation* 55: 391-404.

Valentin, E., and Lambeau, G. What can venom phospholipases  $A_2$  tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases  $A_2$ ? 2000. *Biochimie*. 82: 815-31. Review.

Valentin, E., Lambeau, G. What can venom phospholipase  $A_2$  tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipase  $A_2$ ? 2002. *Biochimie* 82, 815-31. Review.

van den Bergh, C.J., Slotboom, A.J., Verheij, H.M., de Haas, G.H. The role of aspartic acid-49 in the active site of phospholipase  $A_2$ . A site-specific mutagenesis study

of porcine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> and the rationale of the enzymatic activity of [lysine49] phospholipase A<sub>2</sub> from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* venom. 1988. Eur J Biochem. 176(2):353-7.

Vane, J. Control of the circulation by endothelial mediators. 1993. Inaugural G.B. West Memorial Lecture. Int. Arch. Allergy Immunol.; 101: 333–345.

Verheij, H.M., Slotboom, A.J., de Haas, G.H. Structure and function of phospholipase A<sub>2</sub>. 1981. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 91:91-203.

Vishwanath, B.S., Kini, R.M., Gowda, T.V. Characterization of three edema-inducing phospholipase A<sub>2</sub> enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. 1987. Toxicon. 25(5): 501-15.

Vizotto, L. D. Serpentes: lendas, mitos, superstições e crendices. 2003. Editora Plêiade, São Paulo, 240 p.

Voronov, E., Apte, R.N., Soler, S. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. 1999. J. Venom. Anim. Toxins, v.5, p 5-33.

Warrel, D. A. Clinical features of envenoming of snake bites. In: Envenoming and their treatment. ed. C. Bon and M Goyffon. p.63-76, 1996.

Warrel, D.A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. In: CAMPBELL J.A., LAMAR W.W. 2004. The venomous reptiles of the Western Hemisphere. New York: Cornell University Press,. p.709-715.

Waters. The Science of What's possible. 2007/2008. Chromatography Columns, SPE, Supplies and Water Quality Parts Catalog.

World Health Organization. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. 1981. Who Offset Publication. N. 58, p.23.

Yamaguchi, Y., Shimohigashi, Y., Chiwata, T., Tani, A., Chijiwa, T., Lomonte, B., Ohno, M. Lys-49-phospholipases A<sub>2</sub> as active enzyme for beta-arachidonoyl phospholipid bilayer membranes. 1997. Biochem Mol Biol Int. 43(1):19-26.

Yamakawa, M., Nozaky, M., Hokama, Z. Fractionation of sakishimahabu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions. 1976. In: Ohsaka A, Hayashi K & Sawai Y (Editors), Toxins: Animal, Plant and Microbial. Plenum Press, New York, 97-109.

Zuliani, J.P, Fernandes, C.M., Zamuner, S.R., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. 2005. *Toxicon*. 45(3):335-46.