

Roberta Márcia Marques dos Santos

**Caracterização estrutural e funcional
de um inibidor de PLA₂ presente no plasma da
cascavel sulamericana (*Crotalus durissus terrificus*)**

Belo Horizonte

2005

Roberta Márcia Marques dos Santos

**Caracterização estrutural e funcional
de um inibidor de PLA₂ presente no plasma da
cascavel sulamericana (*Crotalus durissus terrificus*)**

Tese apresentada ao Departamento de
Bioquímica e Imunologia do Instituto de
Ciências Biológicas da FMG como
requisito parcial para obtenção do grau de
doutora em Bioquímica.

Orientadores: Dra. Consuelo Latorre Fortes Dias

Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2005

“Devo ensinar-lhe no que consiste o conhecimento?

Quando souber algo reconhecer aquilo que sabe, e,

Quando não souber, reconhecer que não sabe.

Isso é conhecimento.”

Confúcio

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento especial à Consuelo pela orientação e oportunidade de crescimento profissional. Pelo apoio, confiança, compreensão, incentivo e por todos os ensinamentos, que foram além dos científicos, transmitidos ao longo desses tão proveitosos anos de convivência.

Ao Marcelo Santoro pela orientação.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular, que na sua proporção contribuíram neste trabalho: Maria Inácia, Ana Valentim, Bruno, Eduardo e Luciana.

Aos estudantes que passaram pelo laboratório, e que agora seguem outros caminhos, mas que também colocaram, algum dia, suas mãos nesse trabalho: Carol, Gabi, Juliana, Izabela, Ana Paula e Alison.

Ao Dr. Luiz Guilherme e a Patrícia Cota, pela preparação da coluna de afinidade com CB.

Aos pesquisadores da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da FUNED, que de uma forma ou de outra, contribuíram com este trabalho.

À Dona Alice, Dário e Andreza, pela sua valiosa contribuição.

À Lu, Regina, Nelmam e Márcia e Paty pelo apoio e carinho constante.

Ao Dr. Michael Richardson, pela sempre disponível contribuição, principalmente quando o assunto era a língua inglesa.

À Dra. Maria Elena e Dra. Leida Calegário pela colaboração imprescindível nos experimentos de binding.

Ao Dr. Carlos Olórtogui e Dr. Claude Granier pela colaboração nos experimentos de spot.

À todos do laboratório de Físico-Química de Proteínas, especialmente ao Thiago, Jamil e Janete, pelo carinho de sempre.

A todos os meus amigos que souberam compreender as minhas ausências, especialmente Lu, Regis, Léo, Carol, Rô, Max e Lívia.

Às minhas amigas do coração, Ana e Karla, que dividiram comigo as alegrias e as incertezas dessa fase.

Aos meus pais e irmãos pelo carinho e apoio incondicional.

Resumo

A crotoxina (Ctx) é o principal componente tóxico da peçonha da cascavel sulamericana *Crotalus durissus terrificus*. É um heterodímero composto por duas subunidades: CB, uma PLA₂ tóxica, e CA, que não apresenta atividade enzimática nem neurotóxica. No plasma da cascavel está presente uma proteína, denominada CNF, para fator neutralizante de *C. d. terrificus* capaz de inibir a atividade enzimática e letal do veneno homólogo. A ação inibidora de CNF se deve a substituição de CA no complexo Ctx (CACB) formando um novo complexo estável CB/CNF. No presente estudo, uma nova metodologia para purificação de CNF foi desenvolvida. CNF está presente no plasma da serpente como uma mistura das formas glicosilada e deglicosilada. Foi demonstrado que a glicosilação não é necessária para sua atividade inibidora de PLA₂. A interferência de CNF na ligação do complexo Ctx marcado radioativamente, formado por CA e uma isoforma de CB, CA-¹²⁵ICB₂, à sinaptossomas cérebro corticais de rato foi avaliada em diferentes condições. A competição por Ctx e CA não marcados foi feita em paralelo. CNF foi capaz de inibir a ligação da toxina aos sinaptossomas em todas as condições testadas, incluindo o deslocamento de Ctx após a sua ligação à membrana sinaptossomal. O modelo de interação entre Ctx, o receptor e CNF, previamente proposto, foi aprimorado. Os segmentos de peptídeos lineares, provavelmente envolvidos na interação entre as proteínas nos complexos de CA ou CNF com duas isoformas de CB (CB₁ e CB₂) foram determinados pela técnica de síntese múltipla de peptídeos lineares. Esses segmentos foram identificados em um modelo tridimensional, proposto para as isoformas de CB, como possíveis sítios de interação linear.

ABSTRACT

Crotoxi (Ctx) is the main toxic component of the venom of *Crotalus durissus terrificus*, the South American rattlesnake. Ctx is a heterodimer of CB, a neurotoxic phospholipase A₂ (PLA₂) and CA, which is devoid of any enzymatic or neurotoxic activity. The blood plasma of *C. d. terrificus* contains an endogenous inhibitor, named CNF for *Crotalus* neutralizing factor that is able to inhibit both lethal and enzymatic activities of the homologous venom. The biological action of CNF is due to the replacement of CA in Ctx complex (CACB) and formation of a new stable complex CNFCB. In the present work, a novel methodology for purification of active CNF from the crude snake plasma was developed. CNF in nature exists as a mixture of a glycosylated and a deglycosylated forms and the carbohydrate moiety was shown to be unnecessary for its inhibitory activity. The interference of CNF on the binding of radio iodinated Ctx, composed of CA and a single isoform of (CB CA-¹²⁵ICB₂), to rat brain synaptosomes was evaluated under different conditions. Competition by unlabeled Ctx and CA was run in parallel. CNF was able to inhibit the binding of Ctx to synaptosomes under all condition tested, including displacing the toxin already bound to its membrane target. A model of interaction between Ctx, target receptor and CNF, previously proposed, was updated. The linear peptide segments probably involved in the interaction between the proteins in the complexes of CA or CNF with two main isoforms of CB (CB₁ and CB₂) were mapped by spot multiple peptide synthesis. These segments were identified in a three-dimensional model proposed for the CB isoforms as possible linear interaction sites.

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 - <i>Crotalus durissus terrificus</i> - cascavel.....	15
2 - Representação esquemática de uma junção neuromuscular.....	22
3 - Estrutura primária de CB ₁ e CB ₂	56
4 - Purificação de CNF.....	64
5 - Deglicosilação de CNF.....	66
6 - Cromatograma da purificação do complexo CA-CB ₂ e CA- ¹²⁵ ICB ₂ em coluna de filtração molecular em Sephadex G-25.....	69
7 - Curva de associação de CA- ¹²⁵ ICB ₂ à sinaptossoma cérebro cortical de rato.....	72
8 - Cinética de ligação de CA- ¹²⁵ ICB ₂ a sinaptossomas cérebro cortical de rato.....	73
9 - Inibição da atividade específica de CA- ¹²⁵ ICB ₂ à sinaptossoma cérebro cortical de rato pelo complexo não marcado e seus componentes isolados.....	74
10 - Avaliação preliminar do efeito de CNF na ligação de CA- ¹²⁵ ICB ₂ a sinaptossomas	78
11 - Inibição da ligação específica de CA- ¹²⁵ ICB ₂ a sinaptossomas (S) por CNF.....	80
12 - Deslocamento de CA- ¹²⁵ ICB ₂ , ligado ao sinaptossoma, por CNF.....	81
13 - Curva de saturação para ligação de CA- ¹²⁵ ICB ₂ a sinaptossoma na presença de CA-CB ₂ e CNF como competidores.....	82
14 - Membranas após ligação de CA-FA ou CNF-FA na concentração de 10 µg/mL.	85
15 - Reatividade dos peptídeos da membrana com 10 µg/mL de CA-FA - valores arbitrários de intensidade.....	86

16 - Reatividade dos peptídeos da membrana com 10 µg/mL de CA-FA - razão Sinal/Ruído (S/R).....	87
17 - Reatividade dos peptídeos da membrana com 10 µg/mL de CNF-FA - valores arbitrários de intensidade.....	88
18 - Reatividade dos peptídeos da membrana com 10 µg/mL de CNF-FA - razão Sinal/Ruído (S/R)	89
19 Mapeamento dos segmentos lineares de peptídeos na sequência primária de CB ₁ e CB ₂ após reação com CA-FA ou CNF-FA.....	90
20 - Mapeamento dos segmentos lineares de peptídeos na sequência primária de CB ₁ e CB ₂ após reação com CA-FA ou CNF-FA	92
21 - Identificação das regiões reativas para CA na estrutura tridimensional de CB ₁ e CB ₂	94
22 - Identificação das regiões reativas para CNF na estrutura tridimensional de CB ₁ e CB ₂	95
23 - Representação esquemática das interações entre CA-CB, o seu receptor na membrana pré-sináptica e CNF.....	104

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Inibidores de PLA ₂ isolados do plasma de serpentes.....	32
2 - Subclassificação dos Inibidores de PLA ₂ de serpentes da classe γ em I e II.....	33
3 - Relação dos peptídeos sintetizados e imobilizados em membrana (técnica SPOT).....	57
4 - Atividade fosfolipásica residual de CNF tratado ou não com PNGaseF.....	67
5 - Reações de competição entre CA- ¹²⁵ ICB ₂ , CACB, CA e CB, pela ligação a sinaptossomas (S) cérebro corticais de rato.....	75
6 - Condições de incubação e IC ₅₀ dos experimentos de binding de CA- ¹²⁵ ICB ₂ a sinaptossomade cérebro de rato (S), na presença de CA-CB ₂ ou CNF como competidores.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

CA-FA - subunidade ácida da crotoxina conjugada à fosfatase alcalina

CAPT - proteína aceptora de crotoxina em *Torpedo*

CBP-50 - proteína ligadora de cálcio, com 50 kDa e capacidade de se ligar a ctx

CICS - inibidor de crotoxina do soro de *Crotalus*

CNF - fator neutralizante de *Crotalus durissus terrificus*

CNF-FA - CNF conjugado à fosfatase alcalina

CRD - domínio de reconhecimento de carboidrato

Ctx - crotoxina

PNGaseF - peptídeo N-glicosidase F

SPOT - síntese múltipla de peptídeos

SSVs - pequenas vesículas sinápticas

SMPR - seqüência mínima de peptídeos reativa

TCBP49 - proteína ligadora de cálcio que se liga a taipoxina

U-PAR - receptor ativador de plasminogênio tipo uroquinase

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 <i>Crotalus durissus terrificus</i>	14
1.2 Crotoxina.....	18
1.3 Inibidores naturais de fosfolipases de serpentes.....	28
1.4 Fator Neutralizante de <i>C. d. terrificus</i> - CNF.....	34
2. JUSTIFICATIVA.....	40
3. OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo Geral.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4. METODOLOGIA.....	43
4.1 Obtenção da crotoxina e suas subunidades.....	43
4.2 Purificação de CNF.....	43
4.3 Determinação da atividade inibidora de PLA ₂	44
4.4 Teste da presença de açucares ligados à CNF.....	45
4.5 Teste de inibição da atividade fosfolipásica de CNF após deglicosilação.....	46
4.5 Experimentos de “Binding”.....	47
4.5.1 Preparo de sinaptossomas cérebro-cortical de rato.....	47
4.5.2 Marcação de CB ₂ com ¹²⁵ I-Na.....	48
4.5.3 Condições gerais para os experimentos de “binding.”.....	49
4.5.4 Teste de associação.....	51
4.5.5 Cinética de Associação.....	51
4.5.6 Experimento de inibição da ligação de CA- ¹²⁵ ICB ₂ por CA, CB ₂ e CA/CB ₂	51

4.5.7	Experimento de competição da ligação de CA- ¹²⁵ ICB ₂ por CNF.....	52
4.5.8	Curva de competição de CA- ¹²⁵ ICB ₂ por CNF.....	53
4.5.9	Cinética de dissociação.....	53
4.5.10	Experimentos de saturação da ligação.....	54
4.6	Análise da interação entre CA /CB e CNF/CB pela técnica de síntese múltipla de peptídeos lineares.....	54
4.6.1	Síntese de peptídeos.....	54
4.6.2	Conjugação de CA e CNF a Fosfatase Alcalina.....	58
4.6.3	ELISA para teste dos conjugados.....	58
4.6.4	Ensaio de ligação de CA e CNF aos peptídeos lineares de CB.....	59
4.6.5	Ensaio de Competição.....	61
4.6.5.1	Ensaio com elevada concentração de sal.....	61
4.6.5.2	Ensaio de competição entre o conjugado e a proteína livre.....	61
4.6.5.3	Competição entre CA e CNF.....	61
4.7	Identificação das prováveis regiões de interação entre CA/CB e CNF/CB em um modelo tridimensional das isoformas.....	62
5	RESULTADOS.....	63
5.1	Purificação de CNF.....	63
5.2	Determinação da presença de açúcares e sua influência na atividade de CNF.....	65
5.3	Marcação de CB ₂	68
5.4	Experimentos de ligação.....	70
5.4.1	Competição da ligação de CA- ¹²⁵ ICB ₂ por CNF.....	76
5.5	Ligação de CA-FA e CNF-FA aos peptídeos lineares de CB ₁ e CB ₂	83
5.5.1	Ligação de CA-FA aos peptídeos lineares de CB ₁ e CB ₂	83

5.5.2	Ligação de CNF-FA aos peptídeos lineares de CB ₁ e CB ₂	84
5.5.3	Ensaio de competição.....	91
5.5.4	Identificação das prováveis seqüências de interação entre CA/CB e CNF/CB em um modelo de estrutura de CB ₁ e CB ₂	93
6.	DISCUSSÃO.....	96
7.	CONCLUSÃO.....	112
8.	REFERÊNCIAS.....	113

1. Introdução

1.1 *Crotalus durissus terrificus*

Crotalus durissus terrificus é uma serpente da família Viperidae, subfamília Crotalinae, gênero *Crotalus*, popularmente conhecida por cascavel, cascavel-quatro-ventas, boicininga, maracambóia, maracá, dentre outras denominações. A principal característica do gênero é a presença de um chocalho ou guizo na ponta da cauda que emite ruído característico, denunciando a sua presença. O corpo apresenta um colorido de fundo castanho-claro, sobre o qual se destaca uma fileira de manchas dorsais losangulares, marrons, mais ou menos escuras, marginadas de branco ou amarelo (Figura 1) (CARDOSO et al., 2003; CAMPBELL e LAMAR, 1989).

No Brasil, o gênero *Crotalus* está representado por uma única espécie, *Crotalus durissus*, com cinco subespécies: *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus marajoensis*. As serpentes desse gênero são encontradas em regiões áridas e semi-áridas do Nordeste, áreas abertas do Sul, Sudeste e Norte, raramente presentes na faixa litorânea, em florestas ou no Pantanal. A distribuição geográfica da subespécie *Crotalus durissus terrificus* se estende pelo oeste do país, até algumas áreas abertas de Mato Grosso, Rondônia, Amazonas e Pará (CARDOSO et al., 2003; Brasil, 1999).



Figura 1- Foto da serpente *Crotalus durissus terrificus*, popularmente conhecida como cascavel.

O maior número de acidentes ofídicos notificados no Brasil, se deve à picadas por serpentes do gênero *Bothrops* (cerca de 70%), seguido daqueles causados por *Crotalus durissus*, cujo percentual varia de 6 a 30% com a região. No entanto, o gênero *Crotalus* é responsável pelo maior índice de letalidade devido a ofidismo no Brasil, alcançando índices em torno de 1,5% (Brasil, 1999). Segundo dados da Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais, foram notificados no estado, de 2001 a 2003, 1373 acidentes ofídicos causados por serpentes do gênero *Crotalus*. Destes, chegaram a óbito, 4 vítimas em 2001 e 3 em 2002.

Os sintomas e sinais apresentados pelos pacientes picados por *Crotalus durissus* são conseqüentes às atividades neurotóxica, miotóxica e coagulante do veneno, e em especial, da crotoxina, o seu principal componente (CARDOSO et al., 2003). As manifestações locais do acidente crotálico são pouco expressivas; as marcas das presas podem ser encontradas com edema e eritema discretos ou sem qualquer alteração local. A dor, se presente, é de pequena intensidade (CARDOSO et al., 2003). Os pacientes apresentam sintomas gerais como mal-estar, prostração, náuseas e sonolência. A principal manifestação do envenenamento por *Crotalus*, que inclusive, permite o diagnóstico clínico, é a “fácies miastênica”. Esse quadro típico apresenta ptose palpebral e flacidez da musculatura da face. Dores musculares generalizadas, de aparecimento precoce e mais intenso nos casos mais graves, são manifestações clínicas decorrentes da atividade miotóxica do veneno. São observados também escurecimento da urina, devida à excreção de mioglobina, e alterações no tempo de coagulação sangüínea. Podem ainda ocorrer, insuficiência respiratória aguda ou paralisias respiratórias parciais e paralisias de grupos musculares (CARDOSO et al., 2003; SILVEIRA e NISHIOKA, 1992).

A principal terapêutica disponível e eficaz no combate aos efeitos desastrosos e até mesmo letais, ocasionados pela inoculação de peçonhas através da picada de serpentes, é a administração do soro antiofídico específico (CUPO et al.,1991). O tratamento fundamental consiste na aplicação do soro antiveneno, por via venosa, em dose adequada, o quanto antes possível.

O soro anticrotálico é obtido através da purificação de imunoglobulinas do plasma de animais (geralmente eqüinos), hiperimunizados com pool de veneno extraído de serpentes da espécie *Crotalus durissus*. Os soros hiperimunes podem conter moléculas de imunoglobulinas inteira ou sua fração F(ab) ou F(ab')₂. Por serem heterólogos, a aplicação dos soros antiofídicos em humanos, pode desencadear reações indesejadas. Dependendo do caso, os efeitos colaterais podem ser graves, causando inclusive choque anafilático. A utilização de partes da molécula de imunoglobulina tem por objetivo diminuir os efeitos colaterais causados pelo soro (CHIPPAUX e GOYFFON, 1998; CARDOSO et al., 2003). No Brasil, os soros utilizados nos tratamentos de acidentes ofídicos são compostos pela fração F(ab')₂. São produzidos por três Laborat6rios Oficiais, a Funda7ao Ezequiel Dias (FUNED), o Instituto Butantan (IB) e o Instituto Vital Brazil, e distribu6dos gratuitamente pelo Minist6rio da Sa7de para todo o territ6rio nacional.

1.2 Crotoxina

A peçonha de *C. d. terrificus*, tem como principal componente tóxico a crotoxina (Ctx), que se destacou por ser a primeira toxina de serpente a ser cristalizada (HABERMANN e BREITHAUPT, 1978), e é uma das toxinas de serpentes mais estudadas. Trata-se de uma β -neurotoxina composta por duas subunidades, uma básica (CB) e outra ácida (CA), com razão molar de 1:1. Apesar de estas subunidades estarem unidas apenas por forças eletrostáticas, são necessárias condições drásticas para sua separação, como pH ácido (em torno de 4) ou uréia 6M (RUBSAMEN et al., 1971, HENDON e FRAEKEL-CONRAT 1971, BREITHAUPT, 1976a).

A subunidade básica, CB, possui cadeia polipeptídica única composta por 122 resíduos de aminoácidos com massa molecular de 14,2 kDa (HENDON e FRAEKEL-CONRAT, 1971; AIRD et al., 1986; CHEN et al., 2004). CB é uma fosfolipase A_2 (PLA₂, EC 3.1.1.4) que catalisa a hidrólise da ligação acil éster na posição sn-2 de 1,2-diacil-sn-fosfoglicerídeos, de forma dependente de íons cálcio (RADVANYI et al., 1989). Além da atividade enzimática possui também atividade neurotóxica (RUBSAMEN et al., 1971).

CA é constituída por 3 cadeias polipeptídicas A, B e C com 40, 35 e 14 resíduos de aminoácidos respectivamente, ligadas por 7 pontes de dissulfeto (BREITHAUPT et al., 1974, AIRD et al., 1985, AIRD et al., 1990). CA, isoladamente, não apresenta atividade enzimática nem neurotóxica. Apesar da inatividade intrínseca, e ausência de ação farmacológica, tem um papel relevante na ação neurotóxica da crotoxina (RUBSAMEN et al., 1971, BREITHAUPT, 1976b). CA, quando complexada a CB, é capaz de diminuir a atividade enzimática *in vitro* de CB

isolado. No entanto, a atividade neurotóxica intravenosa em camundongos, do complexo CACB foi cerca de 12 vezes maior do que aquela apresentada por CB isolado (RUBSAMEN et al., 1971, BREITHAUPT, 1976b).

Se aplicado sozinho, CB liga-se a membranas de eritrócitos ou membranas ricas em receptores de uma maneira linear não saturável, indicando que ele é absorvido por um grande número de sítios não específicos de baixa afinidade. Na presença de um excesso do componente A no entanto, essa ligação não saturável é prejudicada e o componente B, agora, liga-se apenas a um número limitado de sítios de alta afinidade. Portanto, CA evita a ligação de CB à “sítios de baixa afinidade”. Por isso lhe foi atribuído um papel de chaperonina, uma vez que direciona CB para sítios de maior afinidade. Tal ação explicaria o aumento da neurotoxicidade do complexo em relação ao componente B isoladamente (HABERMANN e BREITHAUPT, 1978; JENG et al., 1978; BON e JENG, 1979). Em estudos da ligação da crotoxina a órgão elétrico de *Torpedo marmorata*, Délot e Bon (1993), sugeriram que a associação de CA com CB é capaz de tornar CB de uma fosfolipase (com afinidade por fosfolípedes de membrana) em uma neurotoxina (com afinidade por um receptor nas membranas neuronais). Essa ação poderia ser devida ao fato de CA mascarar o domínio responsável pela ligação de baixa afinidade ou por modificar a conformação no sítio tóxico. CB isolado da Ctx é capaz de abolir a ligação de alta afinidade de $^{125}\text{IAtx}$ (amoditoxina, isolada de *Vipera ammodytes ammodytes*) à membrana pré-sináptica de *Torpedo marmorata*, em contraste com CB associado a CA (KRIZAJ et al., 1997). Portanto, foi proposto que CA não se comporta simplesmente como uma chaperonina para CB, diminuindo a sua absorção não específica, mas também confere uma especificidade de ligação distinta à crotoxina (KRIZAJ et al., 1997).

Quando da ligação da crotoxina aos seus alvos, o complexo CA/CB é desfeito, CB liga-se a membrana e CA é liberado em solução. Há dois modelos propostos para explicar o mecanismo molecular envolvido na ligação de CB à membrana: o da dissociação e do complexo ternário. No primeiro, CA e CB dissociam-se antes da ligação de CB à seu sítio na membrana. Já o modelo do complexo ternário transiente, considera que a crotoxina liga-se à membrana antes da dissociação de CA (BON et al., 1979, DÉLOT e BON, 1993, KRIZAJ et al, 1996). Seja qual for o modelo, uma questão é clara, a reversibilidade da ligação CA/CB é de grande importância para a ação neurotóxica da crotoxina, pois a conversão de um complexo dissociável para um não dissociável abole completamente a sua neurotoxicidade (HENDON e TU, 1979, LENNON et al., 1990).

Na peçonha de *C. d. terrificus* a Ctx está presente como uma mistura de isoformas que, juntas, representam de 50 a 80% do total de proteínas (FAURE e BON, 1987). Faure e Bon (1988) purificaram de uma única serpente, duas isoformas de CA e quatro isoformas de CB. Dentre as isoformas analisadas observou-se que estas apresentavam de um a sete resíduos de aminoácidos diferentes. Várias isoformas de crotoxina foram formadas pela combinação, ao acaso, das diferentes isoformas de CA e CB. A comparação quantitativa das propriedades enzimáticas e farmacológicas dos complexos de Ctx reconstituídos indicou que houve uma diferença, quanto a esses parâmetros, que foi independente de CA. Portanto, as atividades enzimática e farmacológica da Ctx são influenciadas pela isoforma de CB no complexo. Mais tarde demonstrou-se que a multiplicidade e a diversidade das isoformas de Ctx resultam, no caso de CA, de modificações pós-traducionais que ocorrem em um precursor e, no caso de CB, da expressão de diferentes RNAs mensageiros (FAURE et al., 1994)

A crotoxina, como outras β -neurotoxinas (taipoxina, notexina, β -bungarotoxina) age principalmente a nível pré-sináptico na junção neuromuscular bloqueando a liberação de acetilcolina (Figura 2). A ação das neurotoxinas é geralmente trifásica; há uma supressão inicial da transmissão, seguida por uma fase de aumento que evolui para uma terceira fase de declínio e completa ausência da transmissão neuromuscular (HARRIS, 1985, citado por KINI e EVANS 1989). Experimentos em eletroplaca de *Electrophorus electricus* (poraquê, peixe elétrico da bacia amazônica) e microsacos de *Torpedo marmorata* (peixe elétrico) demonstraram que a crotoxina possui também uma ação pós-sináptica (BON et al., 1979).

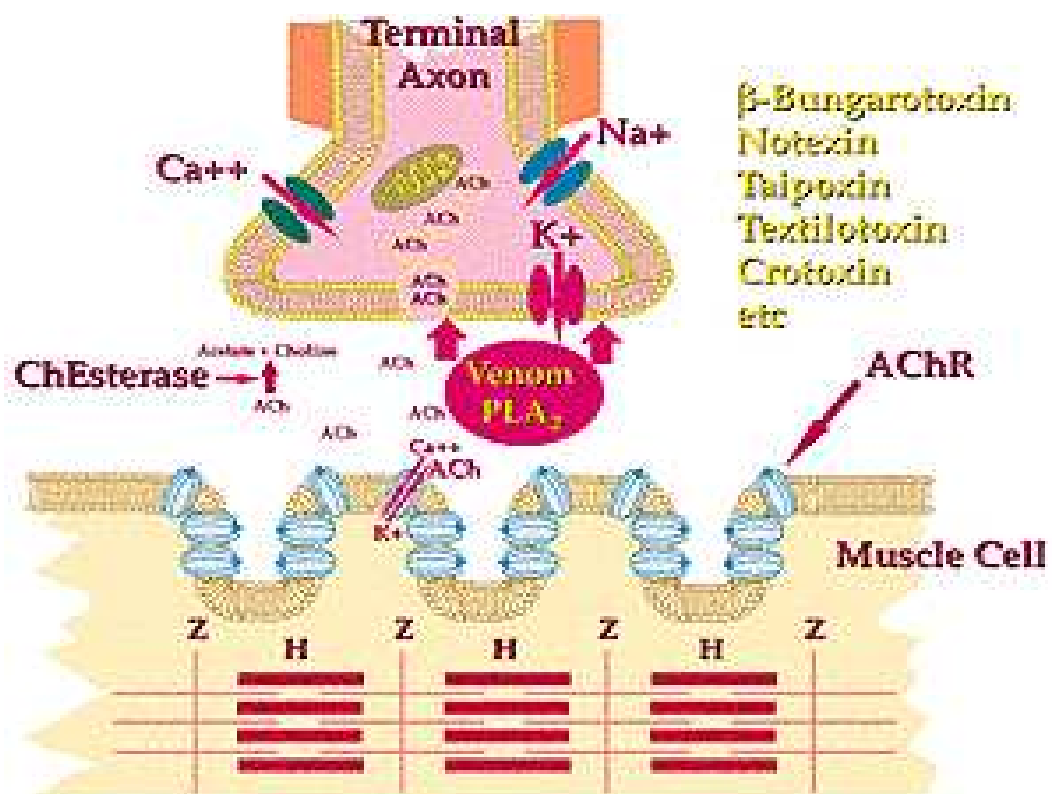


Figura 2 - Representação esquemática de uma junção neuromuscular.

A figura ilustra, resumidamente, a ação de PLA₂ de neurotoxinas pré-sinápticas de serpentes, inibindo a liberação de acetilcolina na fenda sináptica.

(Fonte: "Clinical Toxinology web site").

Já em 1966, Vital Brazil havia demonstrado que a crotoxina provavelmente interage com receptores de acetilcolina e também com outros sítios na membrana da fibra muscular, levando ao bloqueio da transmissão neuromuscular. A ação pré-sináptica é responsável pelo efeito paralisante no sistema respiratório, que é o principal mecanismo de toxicidade do veneno de *C. d. terrificus*. A crotoxina possui atividade hemolítica e miotóxica e também é responsável por causar nefrotoxicidade aguda em rins isolados de ratos (BREITHAUPT, 1976b; MONTEIRO et al., 2001; SALVINI et al., 2001). Essas ações explicam, portanto, os sintomas do envenenamento pelo acidente crotálico descritos anteriormente.

Apesar das várias décadas de estudo das fosfolipases A₂ neurotóxicas e de serem reconhecidas por se ligarem a receptores de membranas neuronais e não neuronais, o mecanismo molecular de ação destas toxinas ainda não está completamente esclarecido (BON, 2000; MONTECUCCO e ROSSETTO, 2000; KRIZAJ e GUBENSEK, 2000). Ao longo dos anos, têm sido propostos alguns modelos de mecanismo de ação havendo, inclusive, divergência entre eles.

Em 1989, Kini e Evans propuseram um modelo hipotético para explicar os efeitos farmacológicos específicos, tais como neurotoxicidade pré-sináptica, miotoxicidade, cardiotoxicidade e anticoagulante, exibidos pelas PLA₂ de venenos. Esse modelo de interação proteína-proteína considera que, para iniciar um ataque específico, o veneno após entrar no sangue, permanece na circulação até alcançar um órgão ou tecido particular, pelo qual possui afinidade. Isto implica em um sítio específico como requisito primário, cuja presença distingue uma célula alvo de outra não alvo. Os sítios alvo são reconhecidos por um sítio farmacológico específico na superfície da enzima, que são complementares um ao outro na distribuição da densidade de carga, hidrofobicidade e conformação, tendo uma ligação de alta

afinidade. Após a ligação específica, a PLA₂ pode hidrolisar os fosfolípidos vizinhos, o que pode ou não ser necessário para a indução dos efeitos farmacológicos. Portanto, este modelo propõe que as moléculas alvo são proteínas (ou glicoproteínas) localizadas na superfície das células alvo, porém consideram que os domínios lipídicos em torno da molécula alvo tenham um papel significativo.

SIMPSON et al (1993), consideram que, diferente da maioria das toxinas potentes que são enzimas, as neurotoxinas PLA₂ não são endocitadas para exercer os seus efeitos. Estas toxinas se ligam, portanto, à superfície celular e ocorre um rearranjo, que dá então acesso ao substrato na membrana. E é neste sítio que as toxinas provocam o bloqueio da transmissão neuromuscular.

O modelo proposto por Montecucco e Rossetto (2000) considera que haja a endocitose das β -neurotoxinas. Os autores sugerem que o complexo receptor-toxina pode reagir na zona ativa pré-sináptica, onde ocorre a fusão de pequenas vesículas sinápticas (SSVs - "small synaptic vesicles"). Dessa forma as toxinas podem entrar no lúmen das vesículas durante a liberação do seu conteúdo de neurotransmissores e se tornarem internalizadas. Após a fusão da vesícula pelo fechamento das bordas, a toxina residirá dentro do lúmen do SSV, que é rico em íons Ca²⁺, necessários para manutenção da atividade fosfolipásica. Ácidos graxos e lisofosfolípidos serão gerados como produtos da hidrólise dos fosfolípidos da membrana do lúmen. Este modelo explicaria o fato de que a lavagem da neurotoxina, ou a adição de anticorpos antitoxina específicos ou íons inibitórios (Sr²⁺), são eficazes na prevenção da paralisia, causada pelo envenenamento, quando feitos rapidamente após o contato da toxina. De fato, quanto mais tempo a junção neuromuscular é exposta a toxina, espera-se que mais toxina seja internalizada, tornando-se portanto, inacessível aos anticorpos, Sr²⁺ e protegida de lavagens (MONTECUCCO e ROSSETTO, 2000).

O modelo proposto por KRIZAJ e GUBENSEK (2000), leva em consideração o fato de haver uma heterogeneidade de ligação das β -neurotoxinas, porém, com efeitos patofisiológicos semelhantes. Neste modelo, as β -neurotoxinas, têm acesso às terminações nervosas através de diferentes sistemas, como por exemplo, por endocitose mediada via receptor, endocitose clatrina dependente ou endocitose clatrina independente. Uma vez na célula nervosa, as β -neurotoxinas prejudicam a função das vesículas sinápticas pela hidrólise dos fosfolípides na porção interna da bicamada vesicular. Devido à mesma etapa final na ação das β -neurotoxinas, a hidrólise de fosfolípedes teria, como conseqüência, os efeitos semelhantes de envenenamento das β -neurotoxinas.

Tem sido considerada, também, a hipótese da participação dos produtos da fosfolipase na atividade farmacológica da crotoxina. Os ácidos graxos liberados dos fosfolípides de membrana pelas fosfolipases são moléculas importantes de sinalização celular, podendo agir com moduladores ou segundo mensageiros. A ação da crotoxina sobre preparações sinaptossomais gera palmitato e aradonato. Uma vez que o palmitato tem papel nos processos de acilação de proteínas e o aradonato participa de eventos de transdução de sinal, esses mecanismos podem estar relacionados com as ações neurotóxicas da crotoxina (KATTAH et al., 2002).

Uma questão importante que certamente auxilia na elucidação do mecanismo de ação das β -neurotoxinas, é a identificação das moléculas envolvidas na interação das mesmas com o sítio alvo. Várias proteínas foram descritas como ligadoras de fosfolipases secretórias (para revisão ver LAMBEAU e LAZDUNSKI, 1999; VALENTIN e LAMBEAU, 2000). No caso da crotoxina, através de cromatografia de afinidade com a mesma imobilizada, foram purificadas proteínas de frações de

membranas sinápticas de cobaio e cérebro de suínos. De cobaio foram purificados polipeptídeos de 87, 65 e 50 kDa e dois polipeptídeos de 50 e 18 kDa de cérebro de suínos. Os peptídeos de 65 e 18 kDa foram considerados componentes de proteínas ligadoras de crotoxina até então não identificadas (HSEU et al., 1997). Posteriormente, a seqüência da proteína de 50Kda, denominada CBP-50, foi elucidada através de sequenciamento de cDNA isolado de uma biblioteca de cérebro de rato. Essa proteína possui 315 resíduos de aminoácidos, com seqüência sinal de 19 resíduos e uma massa molecular calculada de 34.861 Da. Contém 6 domínios potenciais de ligação a Ca^{2+} , um sítio de glicosilação e uma grande quantidade de aminoácidos ácidos. Foi observada uma homologia com proteínas ligadoras de cálcio, e por isso foi proposto a substituição do nome de CBP-50 por Crocalbina, para proteína ligadora de cálcio e crotoxina. Crocalbina apresenta homologia de seqüência em torno de 40% com TCBP-49, uma proteína ligadora de cálcio isolada de rato que se liga a taipoxina, uma PLA_2 neurotóxica relacionada à crotoxina. Foi demonstrado que TCBP-49 está presente em estruturas vesicular e reticular presumivelmente dentro do lumem. Tem sido sugerida a ligação da taipoxina à TCBP-49, após ser internalizada no sistema de membranas por endocitose seguida da ligação da toxina em receptores de membrana. A crocalbina pode comportar-se de modo semelhante após a crotoxina ser internalizada. Corroborar com essa hipótese o fato de a maioria das proteínas homólogas a crocalbina estarem distribuídas nos sistemas de endomembranas, e tem sido sugerido que tenham algum papel na síntese de proteínas, modificação, transporte intracelular ou regulação dependente de cálcio (HSEU et al., 1997 e 1999).

Usando a mesma abordagem de purificação, ou seja, cromatografia de afinidade em coluna com crotoxina imobilizada, foi purificada de membranas pré-

sinápticas de órgão elétrico de *Torpedo*, uma proteína de 48 kDa. Essa foi denominada CAPT, Proteína Aceptora de Crotoxina em *Torpedo*. CAPT apresentou massa molecular semelhante à crocalbina; no entanto anticorpos anticrocalbina, não a reconheceram (KRIZAJ et al., 1996; FAURE et al., 2003).

1.3 Inibidores naturais de fosfolipases de serpentes

Relatos a respeito da resistência natural de certos animais a venenos de serpentes, inclusive resistência de serpentes ao próprio veneno, foram descritos pela primeira vez ainda no século XVIII. Vários mecanismos foram propostos para justificar tal resistência como: 1) resultado de tolerância dos tecidos, 2) presença de anticorpos herdados ou adquiridos pela imunização no campo, ou 3) pela presença de antitoxinas humorais no sangue do animal (para revisão ver DOMONT, PERALES e MOUSSATCHÉ, 1991).

Atualmente, a resistência natural a venenos de serpentes é comprovadamente atribuída a dois mecanismos diferentes. No primeiro, uma mutação no gene que codifica o receptor da toxina leva a uma insensibilidade em relação à mesma, como ocorre, por exemplo, no mangusto (*Herpestes ichneumon*). O outro mecanismo de resistência se deve à presença de inibidores solúveis de toxinas no plasma dos animais. Ambos os mecanismos podem ocorrer simultaneamente em um mesmo animal, como é o caso da *Naja naja atra*. Essa serpente possui um receptor de acetilcolina insensível a cobratoxina e o seu soro contém uma proteína antineurotóxica CSA (para revisão ver DOMONT, PERALES e MOUSSATCHÉ, 1991; FAURE, 2000; FORTES-DIAS, 2002)

No caso da resistência devido à presença de proteínas solúveis no plasma foram encontrados fatores com ação antihemorrágica, antimiotóxica e antineurotóxica em diferentes animais (para revisão ver THWIN e GOPALAKRISHNAKONE, 1998). Os inibidores de fosfolipases A₂ tóxicas, muitas das quais exibem uma ampla variedade de efeitos, incluindo neurotoxicidade, danos no tecido muscular e inflamação, foram isolados de serpentes venenosas, não

venenosas, mamíferos e também de extratos de plantas medicinais (para revisão ver LIZANO et al., 2003).

As fosfolipases A_2 são classificadas em secretórias ou citoplasmáticas de acordo com sua localização. As fosfolipases secretórias de venenos, por sua vez, são subdivididas em 3 grupos; I, II e III, de acordo com suas características estruturais específicas. As PLA_2 do grupo I são encontradas em serpentes das famílias Elapidae (cobras) e Hydrophidae (serpentes marinhas). No grupo II, estão as PLA_2 da peçonha de serpentes da família Viperidae (cascavéis, "pit vipers" e víperas do Velho Mundo). As PLA_2 desses dois grupos são particularmente bem conservadas quanto à sua estrutura primária e terciária, mas se distinguem pela presença ou ausência de uma seqüência propetídica chamada "volta pancreática", uma extensão C-terminal, e um grupo específico de ligações dissulfeto. As PLA_2 do grupo III foram primeiro identificadas no veneno de abelhas e depois de outros invertebrados como água-viva e escorpião. Contém 10 cisteínas e são compostas por uma ou duas subunidades. São estruturalmente distintas das enzimas dos grupos I e II, mas apresentam uma homologia de seqüência com as mesmas apenas no "loop" de ligação ao Ca^{2+} e regiões do sítio ativo (GLASER et al., 1993; VALENTIN e LAMBEAU, 2000).

De forma geral os inibidores de PLA_2 de serpentes (PLI) são glicoproteínas oligoméricas com massa molecular que varia entre 75 a 180 kDa e foram classificados, segundo a sua seqüência de aminoácidos em 3 grupos: $PLI\alpha$, $PLI\beta$, $PLI\gamma$ (OHKURA et al., 1997). Como pode ser observado na tabela 1, algumas serpentes possuem simultaneamente inibidores de diferentes grupos. *A. b. siniticus* possui inibidores das 3 classes (α , β e γ), *B. asper* das classes α e β , *T. flavoviridis* α e γ , e *E. quadrivirgata* β e γ .

Os inibidores de PLA₂ do tipo α caracterizam-se pela presença de uma seqüência com o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) de lectinas tipo C, e foram purificadas do plasma de diferentes serpentes. O primeiro foi isolado de *Agkistrodon blomhoffii siniticus*, possui massa molecular de 75 kDa com uma estrutura trimérica composta por 166 resíduos de aminoácidos por subunidade. Inibe preferencialmente fosfolipases ácidas do grupo II (Ohkura et. al, 1993, Okumura et. al, 1999). Inibidores da classe α foram também descritos nas serpentes *Trimeressurus flavoviridis*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops asper*, e *Cerrophidion godmani* (Tabela 1). Como o inibidor de *A. b. siniticus*, eles atuam preferencialmente em PLA₂ ácidas do grupo II do seu próprio veneno (para revisão ver FAURE, 2000; FORTES-DIAS, 2002; LIZANO et al., 2003).

A principal característica dos inibidores de PLA₂ do grupo β é a presença de nove repetições ricas em leucina, seqüência que também está presente em uma α 2-glicoproteína humana (LRG) de função desconhecida. A primeira proteína descrita deste grupo foi isolada do plasma de *A. b. siniticus*, como uma glicoproteína globular ácida de 160 kDa composta por 3 subunidades de monômeros de aproximadamente 50 kDa. Neste caso, um trímero é capaz de formar um complexo estável com 3 moléculas de PLA₂ básica, indicando uma estequiometria de 1:1 entre este PLI β e PLA₂ (OHKURA et al., 1997; OKUMURA et al 1998). Outro representante desta classe foi isolado da serpente não venenosa *Elaphe quadrivirgata*, e é composto por duas subunidades, A e B que apresentam grande homologia entre si (OKUMURA et al., 2002). Em sua revisão LIZANO et al.. (2003), relataram o isolamento, ainda não publicado, de um PLI β purificado de *B. asper*. Esta proteína foi isolada usando o mesmo esquema cromatográfico descrito por Ohkura et al. (1997) e reage com

anticorpos contra PLI β de *A. b. siniticus*. Os PLI β descritos até o momento inibiram apenas fosfolipases do grupo II (OHKURA et al. 1997, OKUMURA et al., 2002).

Os inibidores do tipo γ compõem o maior dentre os três grupos. Até o momento foram descritos em 16 espécies diferentes de serpentes (Tabela 1). Possuem em comum uma estrutura altamente conservada de repetições de cisteínas em seqüência, conhecida como motivos de três dedos (“three-finger motifs”). Esta característica estrutural pode ser encontrada em proteínas com diferentes funções biológicas como as proteínas da super família Ly-6, receptor ativador de plasminogênio tipo urokinase (u-PAR) e Robo-1, esta última expressa em osso de ratos, e que pode estar envolvida em processos inflamatórios (para revisão ver FORTES-DIAS, 2002; LIZANO et al., 2003). Observou-se, no entanto, que havia diferenças entre os membros desse grupo, o que levou LIZANO et al. (2003) a propor uma subclassificação para os inibidores do tipo γ . Esta classificação se baseou principalmente em análises bioquímicas e de seqüência, bem como no perfil de inibição de PLA₂ (Tabela 2). Os PLI γ s da subclasse I apresentam uma composição heteromérica de dois tipos de subunidades (conhecidas como α e β ou A e B), com identidade entre as mesmas menor que 33%. Já os inibidores da subclasse II possuem apenas uma subunidade.

A primeira explicação para a presença de inibidores de toxinas nas serpentes foi para a sua própria proteção, no caso de um extravasamento de veneno das suas glândulas veneníferas. No entanto, esses inibidores foram descritos, mais recentemente, também em serpentes não venenosas como é o caso da *Elaphe quadrigata* e *Python reticulatus* (OKUMURA et al., 1999 e 2002; THWIN et al., 2000), o que sugere que eles possam ter outros papéis fisiológicos importantes como, por exemplo, na regulação da atividade local de PLA₂ (OKUMURA et al., 1999,).

Tabela 1. Inibidores de PLA₂ isolados do plasma de serpentes

Classe	Espécie identificada	Nome	Massa Molecular (kDa) e estrutura oligomérica	Referência
α (CDR-like)	<i>Agkistrodon blomhofii siniticus</i>	PLI α	75, homotrímero	OHKURA et al., 1993
	<i>Bothrops asper</i>	BaMIP	120, homopolímero	LIZANO et al., 1997
	<i>Bothrops moojeni</i>	BmMIP	homopolímero	SOARES et al., 2003
	<i>Cerrophidion godmani</i>	CgMIP-II	120, homopolímero	LIZANO et al., 2000
	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	PLIA e PLIB	160, heteropolímero	KOGAK et al., 1989/INOUE et al., 1991
β (rico em leucina)	<i>Agkistrodon blomhofii siniticus</i>	PLI β	160, homotrímero	OHKURA et al., 1997/OKUMURA et al., 1998
	<i>Bothrops asper</i>	BaMIP β	?	LIZANO et al., dados não publicados
	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	EqPLI β	150, heterotrímero	OKUMURA et al., 2002
γ (u-PAR-like)	<i>Agkistrodon blomhofii siniticus</i>	PLI γ	100, heteropolímero	OHKURA et al., 1997
	<i>Bothrops asper</i>	BaMIP β CgM	?	LIZANO et al., dados não publicados
	<i>Cerrophidion godmani</i>	IP-I	110, homopolímero	LIZANO et al., 2000
	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	CNF/CICS	140-160, homopolímero	FORTES-DIAS et al, 1994/ PERALES et al., 1995
	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	EqPLI γ	130, heteropolímero	OKUMURA et al., 1999
	<i>Lachesis muta muta</i>	LNF1,2	homoplímero	FORTES-DIAS et al., 2003
	<i>Laticauda semifasciata</i>	LsPLI γ	100, heterotrímero	OHKURA et al., 1999
	<i>Naja naja kaouthia</i>	PLI	90, heterotrímero	OHKURA et al., 1994
	<i>Notechis ater</i>	NAI	heteropolímero	HAINS et al., 2000
	<i>Notechis ater serventyi</i>	NAI	heteropolímero	HAINS e BROADY, 2000
	<i>Notechis scutatus</i>	NSI	110, heterotrímero	HAINS e BROADY, 2000
	<i>Oxyuranos scutellatus</i>	OSI	heteropolímero	HAINS e BROADY, 2000
	<i>Oxyuranos microlepidotus</i>	OMI	heteropolímero	HAINS e BROADY, 2000
	<i>Pseudonaja textilis</i>	PTI	heteropolímero	HAINS e BROADY, 2000
	<i>Python reticulatus</i>	PIP	homopolímero	THWIN et al., 2000
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	PLI-I, II	polímero	NOBUHISA et al., 1997	
Sem classificação	<i>Vipera palestinae</i>	ANF	56, ?	OVADIA et al., 1977

Tabela 2 - Subclassificação dos Inibidores de PLA₂ de serpentes da classe γ em I e II

Subclasse	Perfil de inibição	Estrutura oligomérica	Espécies
I	PLA ₂ das classes I, II e III	Heteroméricas (possuem subunidades α [A] e β [B])	<i>Naja Naja Kaouthia</i> <i>Notechis ater</i> <i>Notechis scutatus</i> <i>Oxyuranus scutellatus</i> <i>Elaphe quadrivirgata</i> <i>Agkistrodon blomhoffii siniticus</i> <i>Laticauda semifasciata</i>
II	PLA ₂ da classe II (preferencialmente)	Homoméricas	<i>Bothrops asper</i> <i>Cerrophidion godmani</i> <i>Crotalus durissus terrificus</i> <i>Trimeressurus flavoviridis</i> <i>Python reticulatus</i>

* Classificação segundo LIZANO et al., 2003.

1.4 Fator Neutralizante de *C. d. terrificus* - CNF

Em 1982, MIRANDA et al., estudaram a ação tóxica do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre serpentes da mesma espécie e de *Bothrops neuwiedii diporus*. O veneno de ambas as espécies foi extraído e injetado em exemplares das serpentes citadas. Foi demonstrado que ambas as espécies apresentavam tolerância a quantidades de veneno de *C. d. terrificus* equivalentes a 5×10^{-4} de seu peso corporal. A potência antitóxica do soro de *C. d. terrificus* frente ao veneno crotálico foi similar à do soro antiofídico monovalente obtido de cavalos hiperimunes. Os soros de ambas as espécies de serpentes, em concentrações adequadas, foram capazes de proteger camundongos (*Mus musculus*), quando previamente incubados com 4 DL₅₀ do veneno de *C. d. terrificus*. A resistência ao veneno não foi cruzada, uma vez que espécimens de *C. d. terrificus* não resistiram à injeção de quantidades de veneno de *B. neuwiedii* perfeitamente toleradas pela espécie doadora. A tolerância observada foi explicada pela presença no soro, das serpentes, de componente(s) capaz(es) de inativar a crotoxina, presente na peçonha de *C. d. terrificus*. A ausência de linhas de precipitação em ensaios de dupla difusão do soro frente ao veneno descartou a hipótese de que esses componentes fossem imunoglobulinas. Entretanto, ficou sugerida a neutralização da crotoxina pela formação de complexos inativos com componentes do soro.

A ação protetora do plasma de *C. d. terrificus* foi analisada, mais tarde, frente a venenos de outras serpentes brasileiras das famílias Viperidae e Elapidae. FORTES-DIAS et al. (1990), demonstraram que o plasma de *C. d. terrificus* foi capaz de neutralizar, muito eficientemente, o efeito letal em camundongos não só do veneno de *C. d. terrificus* total, mas também da crotoxina isolada. Os camundongos

foram injetados com 2 DL₅₀ de veneno, previamente incubadas ou não com o plasma de *C. d. terrificus*. Observou-se uma neutralização da atividade letal do veneno de *Bothrops alternatus*, *B. atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedii* e *Lachesis muta muta*, todas da família Viperidae. No entanto o plasma de *C. d. terrificus* não foi capaz de neutralizar a atividade letal do veneno da serpente *Micrurus frontalis* (família Elapidae). Com o aumento da dose para 4 DL₅₀, não se observou mais a proteção contra os venenos de *B. jararaca* e *B. neuwiedii*. Esses resultados demonstraram que o plasma de *C. d. terrificus* é capaz de neutralizar parcial ou completamente, a toxicidade letal de todas as espécies de serpentes da família Viperidae testadas. O plasma de *C. d. terrificus* também foi capaz de inibir a atividade fosfolipásica do veneno homólogo *in vitro*, e essa atividade inibitória foi associada à fração α_1 -globulina plasmática, através de eletroforese em Cellogel (FORTES-DIAS et al., 1990).

O fator antitóxico presente no plasma de *C. d. terrificus*, foi purificado posteriormente (FORTES-DIAS et al., 1991). Foram feitas 3 etapas cromatográficas, primeiro uma troca-aniônica, seguida de uma troca-catiônica e uma cromatografia de fase reversa. Todas as etapas foram acompanhadas por SDS-PAGE e ensaios de atividade fosfolipásica *in vitro*. Após as duas primeiras etapas de purificação, onde se obteve uma proteína com cerca de 95% de pureza, foi observado um aumento da atividade antifosfolipásica em torno de 86 vezes, comparada ao plasma total. Nessa etapa de purificação, a análise em SDS-PAGE apresentou uma banda principal em torno de 23 kDa, acompanhada de uma banda menos expressiva, com massa molecular em torno de 20 kDa e duas bandas contaminantes em torno de 50 kDa, referentes a impurezas. Com a cromatografia de fase reversa, obteve-se uma banda única, com 100% de pureza, com massa molecular de aproximadamente 23 kDa. No

entanto, o produto final não apresentou mais nenhuma atividade antifosfolipásica. Na ocasião, a proteína purificada apresentou uma reação positiva com reagente de Schiff, indicativo da sua natureza glicoproteica. A massa molecular da proteína purificada foi calculada em 23,6 kDa a partir de SDS-PAGE e foi denominada **CNF** (fator neutralizante de *C. d. terrificus*) (FORTES-DIAS et al., 1991).

Dando continuidade aos estudos de CNF, peptídeos obtidos pela clivagem com tripsina foram seqüenciados quimicamente. A partir dessas seqüências, foram construídos oligonucleotídeos usados como sonda no isolamento do cDNA codificador para CNF de uma biblioteca de fígados de *C. d. terrificus*. A seqüência de aminoácidos de CNF foi deduzida a partir do cDNA e confirmada pelos peptídeos. Demonstrou-se que CNF é um polipeptídeo de cadeia única, composto por 181 resíduos de aminoácidos, com massa molecular calculada pela seqüência de aminoácidos de 20,6 kDa, pI de 5,45 e contém 16 resíduos de cisteína. Possui um provável sítio de ligação de carboidrato no resíduo Asn¹⁵⁷. Em cromatografia de filtração molecular e eletroforese em gel sob condições não desnaturantes, CNF nativo exibiu uma massa molecular de 160±10 kDa, compatível com um oligômero de 6 a 8 subunidades (FORTES-DIAS et al., 1994).

O produto da interação de CNF com a crotoxina foi analisado em coluna de gel filtração em sistema HPLC, seguida de fase reversa. Após a integração dos picos e o sequenciamento dos produtos, constatou-se que: 1) a amostra de crotoxina usada no estudo era formada de CA e duas isoformas majoritárias de CB (CB₁ e CB₂), com uma razão molar de aproximadamente 1:1 de CA/CB, e uma proporção de CB₂ duas vezes maior em molaridade do que CB₁; 2) CNF liga-se de maneira saturável à CB, formando um novo complexo, composto por uma molécula de CB para uma subunidade de CNF; 3) das duas isoformas majoritárias de CB

presentes no veneno analisado, CNF apresentou uma associação preferencial por CB₂. Demonstrou-se, portanto, que quando CNF é colocado em contato com a crotoxina, ele se liga a CB, e que o complexo formado é composto por uma molécula de CB para um monômero de CNF. CB, separado de CA, é instável e precipita em solução. No entanto, quando CNF é misturado ao precipitado, forma-se um complexo solúvel que é estável, sendo dissociado somente sob condições desnaturantes. Foi então proposto, o mecanismo de inibição da atividade neurotóxica e fosfolipásica da crotoxina pelo fator presente no plasma da serpente. Essa inibição se deve à substituição, no complexo Ctx, de CA por CNF, formando um novo complexo estável com CB. A reação de troca entre CA e CNF, formando CNF-CB e liberando CA, se assemelha à interação da crotoxina com o receptor pré-sináptico na junção neuromuscular, sugerindo que possa haver semelhança entre CNF e o receptor da crotoxina (FORTES-DIAS et al., 1994).

Em 1995, outro grupo de pesquisadores purificou do soro de *C. d. terrificus* uma proteína denominada CICS (inibidor de crotoxina do soro de crotalus) (PERALES et al., 1995). Esta proteína apresentou características muito semelhantes à CNF e o mesmo mecanismo de ação. A única diferença significativa foi a descrição de que CICS seria formado por um oligômero com duas subunidades não covalentemente associadas de 23 e 25 kDa. O sequenciamento dos 30 primeiros resíduos de aminoácidos das duas subunidades não apresentou diferença entre si, e quando comparados com a seqüência de CNF, apresentou uma única diferença no resíduo 27, onde se observou um resíduo aspartil em CICS e um resíduo cisteinil em CNF. Apesar dessa diferença, considera-se que CICS e CNF sejam denominações distintas para a mesma proteína.

O primeiro inibidor de fosfolipase A₂ de serpente a ter sua seqüência de aminoácidos elucidada foi o de *Trimeresurus flavoviridis* (INOUE et al., 1991). CNF foi o segundo e não apresentou homologia de seqüência primária com o anteriormente descrito. Além disso, CNF foi o primeiro inibidor a ser clonado e se tornou um importante ponto de referência para comparação entre a estrutura primária e espectro de atividade com os inibidores purificados desde então.

Quanto ao espectro de inibição da atividade fosfolipásica, CNF foi capaz de inibir, além da crotoxina, uma fosfolipase básica e 3 ácidas purificadas do veneno de *Lachesis muta muta* (FORTES-DIAS, et al., 1999), fosfolipases ácidas do veneno de *Bothrops jararacussu* (FORTES-DIAS, dados não publicados) e PLA₂ de veneno de abelha (*Apis mellifera*) (grupo III) (FORTES-DIAS, et al., 1994). Nenhum efeito inibitório significativo foi observado sobre a atividade enzimática de PLA₂ secretória de pâncreas suíno (grupo I) (FORTES-DIAS et al., 1994) e PLA₂ secretória humana (grupo III) (FAURE et al., 2000). Também não inibiu a atividade da notexina (*Notechis scutatus*), taipoxina (*Oxyuranus scutellatus scutellatus*) e β-bungarotoxina (*Bungarus multicinctus multicinctus*), todas elas PLA₂ de veneno de serpentes da família Elapidae. No entanto, foi ativo na inibição da atividade fosfolipásica de agkistrodotoxina (*Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*), amoditoxina (*Vipera ammodytes ammodytes*), CbICbII (*Pseudocerastes fieldi*) e Mojave toxina (*Crotalus scutulatus scutulatus*), todas de serpentes da família Viperidae (FAURE et. al, 2000).

Em 1997, quando Okhura et al. propuseram a classificação dos inibidores de PLA₂ de serpentes, descritos até então, em α, β e γ, CNF foi classificado como membro da classe γ, juntamente com os inibidores de *N. n. kaouthia* e *A. b. siniticus*. Após a subclassificação dos inibidores da classe γ em I e II (LIZANO et al., 2003), CNF e os inibidores de *N. n. kaouthia*, *A. b. siniticus* posicionaram-se em

subclasses distintas (tabela 2). Considerando o amplo espectro de inibição apresentado pelos membros da classe γ , foi sugerida uma provável interação de PLI γ com um elemento estrutural comum da molécula de PLA₂, talvez a volta de ligação de cálcio, conservada em todas as classes de PLA₂ (INOUE et al., 1997).

2. Justificativa

Os danos causados por acidentes ofídicos variam de acordo com fatores relacionados à vítima, à serpente e ao tipo e quantidade de veneno injetado. As conseqüências podem ser desde uma simples reação inflamatória no local da picada, passando pela amputação de membros e até mesmo chegar à letalidade. A única terapêutica eficiente e disponível para o tratamento das vítimas de acidentes ofídicos são os soros hiperimunes específicos. A obtenção destes envolve várias etapas, desde a obtenção dos antígenos (venenos) para a imunização dos animais até a purificação das imunoglobulinas. Apesar da sua eficácia comprovada por mais de um século de utilização, e dos avanços tecnológicos obtidos nos processos produtivos, os soros hiperimunes podem causar efeitos colaterais, que nos casos mais graves, pode chegar ao choque anafilático.

A descrição dos inibidores de toxinas naturalmente presentes no plasma das serpentes venenosas abriu uma nova perspectiva quanto à possibilidade da sua utilização como antídoto para tratamento de acidentes ofídicos. Apesar de nos últimos anos ter aumentado o número de inibidores descritos, o volume de informações a respeito dos mecanismos moleculares de ação, da sua interação com as toxinas, estrutura, atividade farmacológica, toxicidade, etc, ainda é incipiente.

CNF é um inibidor que interage com a crotoxina, a qual durante décadas tem despertado o interesse de vários grupos de pesquisa quanto à sua estrutura, mecanismo de ação e atividade enzimática e neurotóxica. Embora muito se tenha investigado, ainda há questões a serem respondidas. Uma vez que CNF tem sido considerado um receptor solúvel da crotoxina, o estudo da interação de CNF/Ctx pode fornecer informações relevantes que auxiliem no entendimento da interação da

toxina com a membrana celular, mecanismo ainda por ser completamente esclarecido.

CNF foi o primeiro inibidor do grupo γ (o maior até o momento) a ser descrito. Considerando a similaridade entre os inibidores desse grupo, o estudo de CNF contribuirá para o esclarecimento de questões importantes da ação dos inibidores de PLA₂. Além disso, CNF inibe além da crotoxina, PLA₂ presentes nas peçonhas de outras serpentes e não se liga à PLA₂ humana, o que corrobora para o seu potencial de utilização terapêutica.

Diante do exposto, o estudo de CNF e da sua interação com a crotoxina contribui para o aumento do conhecimento na área da toxinologia no que se refere às toxinas de serpentes e seus inibidores naturais. Além disso, CNF apresenta-se como uma possibilidade para o desenvolvimento de terapias novas e alternativas para casos de envenenamento por picadas de serpentes, quer seja em sua forma nativa, ou como modelo molecular para o desenvolvimento de antídotos sintéticos ou recombinantes.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Aprofundar o estudo de CNF quanto às suas características estruturais, funcionais e sua interação com a crotoxina.

3.2 Objetivos específicos

1. Desenvolver metodologia de purificação que permita a obtenção de CNF com alto grau de pureza e com manutenção da sua atividade biológica.
2. Avaliar a importância dos carboidratos presentes na molécula de CNF para a sua atividade biológica.
3. Avaliar a ação de CNF na interação da crotoxina com seu alvo biológico em membranas, utilizando sinaptossomas como modelo.
4. Mapear as possíveis regiões lineares de interação intermolecular nos complexos CA-CB (Ctx) e CNF-CB, através do método de síntese múltipla de peptídeos, "spot", e localiza-los na estrutura tridimensional de CB.

4. Metodologia

4.1 Obtenção da crotoxina e suas subunidades

A crotoxina foi obtida do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por cromatografia de gel filtração em Sephadex G-75 (Seki et al., 1980) e posterior fracionamento de CA e isoformas de CB por cromatografia de fase reversa (Fortes-Dias et al., 1994). Para isso, quinhentos microgramas de Ctx foram aplicados a uma coluna Sephasil Peptide C18 5 μ 4.6/250 (Pharmacia Biotech). As fases móveis foram TFA 0,1% em água (A) e TFA 0,1% em acetonitrila (B). Frações de 0,5 mL foram eluídas em um volume de 40 mL com um gradiente linear de 25 a 35% de B. Separou-se a subunidade A das 3 isoformas de CB (CB₁, CB₂ e CB₃). Nos experimentos foram usados tanto o complexo Ctx contendo misturas das isoformas de CB, quanto formada pela combinação de CA e CB₂ apenas. CA usado foi uma mistura de isoformas presente na preparação.

4.2 Purificação de CNF

Para obtenção do plasma de *Crotalus durissus terrificus*, a serpente, previamente anestesiada em gelo seco, foi decaptada e seu sangue coletado sob gravidade, individualmente, em béquer de 50 mL previamente heparinizado com 0,25 mL de liquemine diluídos 1:10 (500 U). O sangue foi deixado em repouso à

temperatura ambiente por aproximadamente 4 horas. O plasma foi coletado e centrifugado a 3.000 rpm, por 20 min a 4 °C . O plasma sobrenadante foi dialisado contra água, liofilizado e estocado a -20 °C.

CNF foi purificado do plasma da serpente *Crotalus durissus terrificus* em duas etapas. Primeiro foi feita uma focalização isoelétrica preparativa em ROTOFOR Preparative IEF cell usando anfólitos com faixa de pH variando entre 3 e 10. Em seguida o material obtido da focalização foi purificado em uma coluna de afinidade com CB da crotoxina imobilizado. À coluna equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, NaCl 0,5 M foi adicionado o CNF parcialmente purificado e a suspensão incubada por inversão por, no mínimo, duas horas a 4°C. Eluiu-se com tampão fosfato citrato pH 7,0, NaCl 0,5 M, recolhendo-se alíquotas de 1,5 mL até que a leitura de absorbância em comprimento de onda de 280 nm fosse zero. Em seguida repetiu-se o mesmo procedimento porém variando-se o pH do tampão fosfato citrato de 6 a 2,85. Na eluição a pH 2,85 foram previamente adicionados 150 µL de Tris-HCl 1 M pH 8,0 aos tubos onde foram coletadas as frações contendo CNF.

4.3 Determinação da atividade inibidora de PLA₂

A avaliação da ação inibidora de CNF sobre a atividade fosfolipásica do veneno de *C. d. terrificus*, foi feita através da medida da atividade fosfolipásica residual sobre gema de ovo incorporada a ágar (HABERMANN e HARDT, 1972), com algumas alterações.

Bactoágar a 1,5% p/v foi fundido em PBS. Após resfriamento em torno de 50°C foram adicionados, sob agitação, CaCl₂ para uma concentração final de

100mM e 1% v/v de uma suspensão de gema de ovo a 25% em PBS. Quinze mL dessa suspensão foram solidificados em placas de Petri de 8 cm de diâmetro, a temperatura ambiente. Foram feitos pequenos poços no gel, nos quais foram aplicados 14 µL das amostras a serem testadas. Tais amostras foram previamente preparadas incubando-se CNF com diluições do veneno de *C. d. terrificus* a 37°C durante 1 h. Em cada placa foi feito um controle positivo, onde se adicionou apenas o veneno crotálico previamente incubado com PBS nas mesmas condições. As placas foram mantidas em câmara úmida a 37°C durante 20 h. O diâmetro do halo transparente formado pela atividade fosfolipásica residual do veneno, foi medido com paquímetro.

4.4 Teste da presença de açúcares ligados à CNF

CNF purificado foi submetido a tratamento com cinco diferentes enzimas capazes de clivar ligações de carboidratos a proteínas, utilizando kit comercial de deglicosilação (Deglycosylation Enhancement Kit - #170-6508 – *BIO-RAD*). O teste de deglicosilação foi feito em condições não desnaturantes e desnaturantes.

No primeiro caso, a 2,5µg de proteína em tampão de reação (Na_2HPO_4 50 mM pH 7,5) foi adicionado 1µl de PNGase F (2,5U/ml) e incubou-se por 24 h a 37°C. A cinco microtubos, foram adicionados 2,5µg de proteína em tampão de reação (Na_2HPO_4 50mM pH 6,0) e cada um recebeu, separadamente, 1µl de uma das seguintes enzimas: NANase II (5U/ml), GALase III (1,5U/ml), HEXase I (42U/ml) e O-Glycosidase DS (1 U/ml). Incubou-se a 37 °C por 2 h.

No teste de deglicosilação em condições desnaturantes, a 2,5µg glicoproteína em tampão de reação adicionou-se solução desnaturante para uma concentração final de 0,1% de SDS e 50 mM de β-Mercaptoetanol. Misturou-se gentilmente e incubou-se a 100 °C por 5min, seguidos de 5min em banho de gelo. Adicionou-se NP-40 (5% v/v), 1µL de PNGase F (2,5 U/mL) e incubou-se por 3 h a 37 °C. Para as enzimas NANase II, GALase III, HEXase I e O-Glycosidase seguiu-se o mesmo protocolo descrito para o teste com PNGase F em condições desnaturantes, usando o tampão de reação Na₂HPO₄ 50 mM pH 6,0 indicado para essas enzimas.

Todas as amostras foram analisadas em SDS-PAGE após tratamento.

4.5 Teste de inibição da atividade fosfolipásica de CNF após deglicosilação

Para a deglicosilação, a 30 µg de CNF foram adicionadas 30 U da enzima PNGaseF – New England Biolabs - (500.000 U/mL) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5, num volume final de reação de 50 µl e incubado a 37 °C por 24 h. Trinta µg de CNF, foram incubados com o mesmo tampão e mesmas condições descritas anteriormente, porém sem a enzima. Das amostras de CNF, incubadas com ou sem PNGaseF descritas anteriormente, foram tomados 27 µg (45 µl), aos quais foram adicionados 20 µg de veneno crotálico (contidos em 5 µL).

Foram feitos os seguintes controles:

- controle 1: 20 µg de veneno crotálico em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5, e 27 µg de CNF (previamente incubada por 24 horas a 37 °C em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5,)
- controle 2: 20 µg de veneno crotálico em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5
- controle 3: 20 µg de veneno crotálico em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5, e 30 U da enzima PNGaseF.

As amostras foram incubadas a 37°C por 1 h e aplicadas nas placas de bactoágar para medida da atividade de PLA₂ residual (item 4.3). Todos os pontos foram feitos em duplicata. Para cálculo da porcentagem de inibição da atividade fosfolipásica para CNF, deglicosilado ou na forma nativa, o controle 2 (contendo apenas o veneno crotálico) foi tomado como referência (100% de atividade fosfolipásica).

4.5 Experimentos de “Binding”

4.5.1 Preparo de sinaptossomas cérebro-corticais de rato

A preparação de sinaptossomas foi realizada segundo Dunkley et al., 1988. Foram utilizados ratos Wistar fêmeas do CEBIO (Centro de Bioterismo do ICB – UFMG). Após decapitação, retirou-se imediatamente o cérebro e removeu-se o córtex, que foi pesado e colocado em solução 1 (sacarose 0,32 M, EDTA 1 mM, DTT 0,25 mM, pH 7,4), para uma concentração final de 10% p/v. O tecido foi homogeneizado em Potter-Elvehj (Thomas Scientific-Swedeboro, EUA) e

centrifugado a 1.000 g durante 10 minutos (Sorvall 5 FB, DuPont Instruments). O precipitado foi descartado e 2 mL do sobrenadante foram adicionados a tubos de ensaio, sobre um gradiente de Percoll contendo 2 mL de solução a 23%, 15%, 10% e 3% de Percoll, respectivamente, do fundo para o topo do tubo. As soluções de Percoll nas diferentes concentrações foram preparadas na solução 1. Centrifugou-se a 32.500 g por 5 min.

A fração presente na interface do gradiente 23% - 15%, correspondente à fração sinaptossomal, foi recolhida com uma pipeta Pasteur, e diluída 1:4 v/v em tampão de incubação (HEPES 25 mM, glicose 10 mM, colina 140 mM, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 0,8 mM, CaCl₂ 1,8 mM, BSA 0,2%, pH 7,4). A mistura foi centrifugada a 15.000 g por 15 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado novamente diluído 1:4 v/v em tampão de incubação, homogeneizado com pistilo e centrifugado como descrito acima. Este procedimento foi repetido quantas vezes foram necessárias, até que todo o Percoll fosse retirado da amostra. O precipitado foi ressuspensionado em 2 mL de tampão de incubação. Todo o procedimento descrito acima foi feito a 4 °C.

A concentração de proteínas na preparação foi determinada pelo método descrito por Lowry et al. (1951), usando soro albumina bovina como padrão.

4.5.2 Marcação de CB₂ com ¹²⁵I-Na

A iodinação de CB₂ com Na¹²⁵I foi realizada usando cloramina T baseando-se no trabalho de Degn et al. (1991). A 0,6 nanomoles de CB₂, contidos em 10µl de PBS, foram adicionados 10µl Na₂HPO₄ 250 mM pH 7,4 e 1 mCi de Na¹²⁵I. A reação

foi iniciada pela adição de 9 nM de cloramina T, preparada em Na₂HPO₄ 50mM. A mistura foi incubada por 45 seg a temperatura ambiente e em seguida diluída pela adição de 0,3 μM de L-tirosina em 500 ul de PBS e 3μM K¹²⁷I em 250 μl de PBS/BSA (0,1%).

O complexo crotoxina (CA/CB) foi refeito pela adição à mistura de 10 μl de CA (0,6 nanomoles), e incubação por 15min a temperatura ambiente. Para a separação da toxina marcada, a mistura foi aplicada à uma coluna de filtração molecular, Sephadex G-25 (0,8 X 18 cm), previamente equilibrada com PBS-BSA (0,1%), e foram recolhidas frações de 750 μL.

A radioatividade de cada fração foi determinada contando-se alíquotas de 3 μL em Contador Gama (Wallac, Uppsala, Sweden), durante 60 seg.

Para verificar o perfil de eluição do complexo CA/CB₂ na coluna de gel filtração Sephadex G-25, fez-se uma purificação do complexo frio, anteriormente à purificação do complexo marcado radioativamente. O complexo frio foi preparado nas mesmas condições e proporções do marcado. Foram recolhidas frações de 750 μL e medida a sua absorvância em comprimento de onda de 280nm.

4.5.3 Condições gerais para os experimentos de “binding”

Os experimentos de “binding” foram baseados no trabalho de Degn et al (1991) como descrito abaixo. As modificações serão destacadas.

Foram utilizados 30 μg de sinaptossoma (tecido) por ponto, contidos em 400 μL. Para determinar a ligação total, incubou-se CA-¹²⁵ICB₂ e o tecido, e para a ligação não específica incubou-se CA-¹²⁵ICB₂, CA/CB₂ e o tecido. O volume final de

cada reação foi 500 µl, o qual foi completado, sempre que necessário, com tampão de incubação. Os tubos foram mantidos a 37°C por 1 h sob agitação. Em seguida, filtrou-se 400 µL (80% do volume) da mistura da reação em filtro GFB (Millipore), que foi imediatamente lavado por 2 vezes com 5 mL de tampão de lavagem (HEPES 5 mM, glicose 10 mM, colina 140 mM, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 0,8 mM, CaCl₂ 1,8 mM 7,0% BSA pH 7,4). A contagem da radiação foi feita em Contador Gama por 60 seg. Todos os pontos foram feitos em triplicata.

A ligação não específica da toxina marcada ao filtro foi medida preparando-se um tubo onde se incubou a toxina diluída em tampão de incubação (o mesmo tampão usado para diluição do tecido, e das proteínas marcada e livre), nas mesmas condições do ensaio. A radioatividade dos filtros foi contada em Contador Gama por 60 s e este valor foi subtraído das amostras correspondentes.

Os dados de competição foram analisados a partir de uma curva dose-resposta sigmoide, de acordo com a equação:

$$Y = \text{Base} + \frac{(\text{Topo} - \text{Base})}{1 + 10^{(X - \text{LogIC}_{50}) \times \text{Inclinação de Hill}}}$$

onde: Topo: valor de Y no platô da curva

Base: valor de Y na base da curva

IC₅₀: concentração do inibidor que compete pela metade da ligação específica

Inclinação de Hill: grau de cooperatividade

A análise dos dados foi feita usando o programa GraphPad Prism versão 4. A potência dos competidores foi expressa como IC₅₀.

4.5.4 Teste de associação

Para verificar a associação do complexo CA/CB₂ marcado ao sinaptossoma, foram testadas 6 concentrações diferentes de CA-¹²⁵ICB₂: 10⁻¹¹ M, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁹ M, 5 x 10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M, 2,4 x 10⁻⁸ M. Para cada concentração de CA-¹²⁵ICB₂ (ligação total), foi feito um ponto com CA/CB₂ não marcado 1000 vezes mais concentrado que o complexo marcado (ligação não específica).

4.5.5 Cinética de Associação

Avaliou-se a cinética de associação de CA-¹²⁵ICB₂ ao sinaptossoma em intervalos de tempo de incubação que variaram de 30 seg a 100 min. Nestes experimentos foi utilizada uma concentração fixa de CA-¹²⁵ICB₂ de 10⁻¹⁰ M e de 10⁻⁶ M de CA-CB₂.

4.5.6 Experimento de inibição da ligação de CA-¹²⁵ICB₂ por CA, CB₂ e CA/CB₂

Para avaliar a interferência de CA, CB₂ e CA/CB₂ sobre a ligação de CA-¹²⁵ICB₂ foram feitos experimentos onde se trabalhou com uma concentração fixa de

CA-¹²⁵ICB₂ de 10⁻¹⁰ M variando a concentração de CA/CB₂, CA ou CB₂: 10⁻¹¹ M, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M, 5.10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 5.10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M.

4.5.7 Experimento de competição da ligação de CA-¹²⁵ICB₂ por CNF

Para verificar o efeito de CNF sobre a ligação de CA-¹²⁵ICB₂ ao sinaptossoma foram testados, preliminarmente, quatro condições diferentes de incubação de CA-¹²⁵ICB₂, CNF e o tecido:

1 - CA-¹²⁵ICB₂, CNF e tecido, incubação por 1 h a 37°C.

2 - incubação prévia de CA-¹²⁵ICB₂ e CNF por 1 h a 37°C, seguida da adição do tecido e incubação por mais 1 h a 37°C.

3 - CA-¹²⁵ICB₂ e tecido incubados por 1 h a 37°C, seguido da adição de CNF e incubação por mais 1 h a 37°C.

4 - CNF e tecido incubados por 1 h a 37°C, seguido da adição CA-¹²⁵ICB₂ e incubação por mais 1 h a 37°C.

Foi realizado um controle onde se fez a ligação total em que CA-¹²⁵ICB₂ foi adicionado ao tecido e incubado por 1 h a 37°C, e outro no qual CA-¹²⁵ICB₂ e CA/CB₂ foram adicionados ao tecido e incubados por 1 h a 37°C.

Em todas as condições descritas acima se trabalhou com concentrações finais de 10⁻¹⁰ M de CA-¹²⁵ICB₂, 10⁻⁶ M de CNF e 10⁻⁷ M de CA/CB₂.

4.5.8 Curva de competição de CA-¹²⁵ICB₂ por CNF

Foi feita uma curva de competição de CA-¹²⁵ICB₂ por CNF em diferentes concentrações deste último e em três condições diferentes de incubação.

Nestes experimentos os tubos nos quais todos os componentes da reação foram adicionadas em uma só etapa, a saber CA-¹²⁵ICB₂, CA/CB₂ e tecido; e CA-¹²⁵ICB₂, CNF e tecido foram incubados a 37 °C por duas horas. O objetivo foi o de padronizar o mesmo tempo de incubação para todos os pontos do experimento e assim poder comparar esses pontos com as outras duas condições cujo tempo total de incubação foi de 2 h.

O esquema abaixo resume as condições testadas:

- CA-¹²⁵ICB₂ + tecido → incubar por 2 h a 37°C (ligação total)
- CA-¹²⁵ICB₂ + CA-CB₂ + tecido → incubar por 2 h a 37°C
- CA-¹²⁵ICB₂ + CNF + tecido → incubar por 2 h a 37°C
- CA-¹²⁵ICB₂ + CNF → incubar por 1 h a 37°C → + tecido → incubar por 1 h a 37 °C
- CA-¹²⁵ICB₂ tecido → incubar por 1 h a 37 °C → + CNF → incubar por 1 h a 37 °C

Os experimentos foram feitos em triplicata, usando-se uma concentração fixa de CA-¹²⁵ICB₂ de 10⁻¹⁰ M, e as seguintes concentrações de CNF e de CA-CB₂ : 10⁻¹² M, 10⁻¹¹ M, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M, 5.10⁻⁸ M , 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M.

4.5.9 Cinética de dissociação

Para verificar se CNF é capaz de deslocar CA-¹²⁵ICB₂ após sua ligação ao sinaptossoma, foram feitos experimentos nos quais se incubou CA-¹²⁵ICB₂ e tecido por 45 min a 37°C e em seguida adicionou-se CNF, incubando-se novamente a 37°C. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo que variaram de 0 a 240 min após a adição de CNF para a leitura de radioatividade. A concentração final usada de CA-¹²⁵ICB₂ foi de 10⁻¹⁰ M, e de CNF foi de 10⁻⁶ M. Cada ponto do experimento foi feito em triplicata.

4.5.10 Experimentos de saturação da ligação

A ligação específica no equilíbrio foi avaliada variando-se a concentração de CA-¹²⁵ICB₂ de 10⁻¹¹ M a 10⁻⁹ M, na presença de um excesso de 1000 vezes de CA-CB₂ ou CNF e 1µg de sinaptossoma. A constante de dissociação no equilíbrio (K_d) foi determinada após análise dos dados da hipérbole retangular usando regressão não linear.

4.6 Análise da interação entre CA /CB e CNF/CB pela técnica de síntese múltipla de peptídeos lineares

4.6.2 Síntese de peptídeos

Para mapear as regiões lineares envolvidas nas interações entre CB/CA e CB/CNF, foi utilizado o método de síntese múltipla de peptídeos (SPOT).

Foram sintetizados 179 peptídeos em membrana de celulose. Cada um dos quais continha 12 resíduos de aminoácidos, superpostos em 11 resíduos, cobrindo os 122 aminoácidos da seqüência de duas isoformas da fosfolipase A₂ da crotoxina, CB₁ e CB₂, na sua forma madura (sem a seqüência sinal). A Fig. 3 mostra as estruturas primárias de CB₁ e CB₂ e a tabela 3 os peptídeos sintetizados. A síntese múltipla foi realizada em sintetizador automático de peptídeos (Abimed Spot Synthesis–ASP222, Langenfeld, Alemanha), conforme metodologia descrita por Molina (1996), no laboratório do Dr. Claude Granier (CNRS, Faculdade de Farmácia de Montpellier, França).

1 10 20 30 40 50
CB1 HLLQFNKMIKFETRKNAI**I**PFYAFYGCYCGWGG**R**GRPKDATDRCCFVHDCC
CB2 SLLQFNKMIKFETRKN**V**PFYAFYGCYCGWGG**Q**GRPKDATDRCCFVHDCC

 60 70 80 90 100
CB1 YGKLAKCNTKWDIY**P**YSLKSGYITCGKGTW**C**EEQICECDRVAAECLRRSL
CB2 YGKLAKCNTKWDIY**R**YSLKSGYITCGKGTW**K**EQICECDRVAAECLRRSL

 110 120
CB1 STYK**Y**GYMFYPDSRCR**G**PSETC
CB2 STYK**N**EYMFYPDSRCR**E**PSETC

Figura. 3 - Estrutura primária de CB₁ e CB₂. A numeração adotada foi a sugerida por Renetseder et al., 1995. Em negrito estão destacados os resíduos substituídos nas duas isoformas.

Tabela 3- Relação dos peptídeos sintetizados em membrana (técnica SPOT). Os peptídeos contendo substituições e os aminoácidos substituídos, nas duas isoformas, estão em **negrito**.

Peptídeo	CB2	CB1	Peptídeo	CB2	CB1
1	LLQFNKMIKFEE	HLLQFNKMIKFEE	57	CNTKWDIY RY SL	CNTKWDIY PY SL
2	LLQFNKMIKFET	LLQFNKMIKFET	58	NTKWDIY RY SLK	NTKWDIY PY SLK
3	LQFNKMIKFETR	LQFNKMIKFETR	59	TKWDIY RY SLKS	TKWDIY PY SLKS
4	QFNKMIKFETR	QFNKMIKFETR	60	KWDIY RY SLKSG	KWDIY PY SLKSG
5	FNKMIKFETRKN	FNKMIKFETRKN	61	WDIY RY SLKSGY	WDIY PY SLKSGY
6	NKMIKFETRKNA	NKMIKFETRKNA	62	DIY RY SLKSGYI	DIY PY SLKSGYI
7	KMIKFETRKN AV	KMIKFETRKN AI	63	IY RY SLKSGYIT	IY PY SLKSGYIT
8	MIKFETRKN AVP	MIKFETRKN AI P	64	Y RY SLKSGYITC	Y PY SLKSGYITC
9	IKFETRKN AVPF	IKFETRKN AI PF	65	RY SLKSGYITCG	PY SLKSGYITCG
10	KFETRKN AVPFY	KFETRKN AI PFY	66	YSLKSGYITCGK	YSLKSGYITCGK
11	FETRKN AVPFYA	FETRKN AI PFYA	67	SLKSGYITCGKG	SLKSGYITCGKG
12	ETRKN AVPFYAF	ETRKN AI PFYAF	68	LKSGYITCGKGT	LKSGYITCGKGT
13	TRKN AVPFYAFY	TRKN AI PFYAFY	69	KSGYITCGKGTW	KSGYITCGKGTW
14	RKN AVPFYAFYF	RKN AI PFYAFYF	70	SGYITCGKGTWC	SGYITCGKGTWC
15	KNA VPFYAFYGC	KNA I PFYAFYGC	71	GYITCGKGTW CK	GYITCGKGTW CE
16	NA VPFYAFYGCY	NA I PFYAFYGCY	72	YITCGKGTW CKE	YITCGKGTW CEE
17	AV PFYAFYGCYC	AV I PFYAFYGCYC	73	ITCGKGTW CKEQ	ITCGKGTW CEEQ
18	VP FYAFYGCYCG	VP I FYAFYGCYCG	74	TCGKGTW CKEQI	TCGKGTW CEEQI
19	PFY AFYGCYCGW	PFY I FYGCYCGW	75	CGKGTW CKEQIC	CGKGTW CEEQIC
20	FY AFYGCYCGWG	FY I FYGCYCGWG	76	GKGTW CKEQICE	GKGTW CEEQICE
21	Y AFYGCYCGWGG	Y I FYGCYCGWGG	77	KGTW CKEQICEC	KGTW CEEQICEC
22	AFYGCYCGW GQ	AFYGCYCGW GR	78	GTW CKEQICECD	GTW CEEQICECD
23	FYGCYCGW GQG	FYGCYCGW GRG	79	TW CKEQICECDR	TW CEEQICECDR
24	YGCYCGW GQGR	YGCYCGW GRGR	80	W CKEQICECDRV	W CEEQICECDRV
25	GCYCGW GQGRP	GCYCGW GRGRP	81	CKEQICECDRVA	CEEQICECDRVA
26	CYCGW GQGRPK	CYCGW GRGRPK	82	KEQICECDRVAA	EEQICECDRVAA
27	YCGW GQGRPKD	YCGW GRGRPKD	83	EQICECDRVAAE	EQICECDRVAAE
28	CGW GQGRPKDA	CGW GRGRPKDA	84	QICECDRVAAEC	QICECDRVAAEC
29	GW GQGRPKDAT	GW GRGRPKDAT	85	ICECDRVAAECL	ICECDRVAAECL
30	WG GQGRPKDATD	WG GRGRPKDATD	86	CECDRVAAECLR	CECDRVAAECLR
31	GG GQGRPKDATDR	GG GRGRPKDATDR	87	ECDRVAAECLRR	ECDRVAAECLRR
32	G GQGRPKDATDRC	G GRGRPKDATDRC	88	CDRVAAECLRRS	CDRVAAECLRRS
33	QGRPKDATDRCC	RGRPKDATDRCC	89	DRVAAECLRRSL	DRVAAECLRRSL
34	GRPKDATDR CCF	GRPKDATDR CCF	90	RVAAECLRRSLS	RVAAECLRRSLS
35	RPKDATDR CCFV	RPKDATDR CCFV	91	VAAECLRRSLST	VAAECLRRSLST
36	PKDATDR CCFVH	PKDATDR CCFVH	92	AAECLRRSLSTY	AAECLRRSLSTY
37	KDATDR CCFVHD	KDATDR CCFVHD	93	AECLRRSLSTYK	AECLRRSLSTYK
38	DATDR CCFVHDCC	DATDR CCFVHDCC	94	ECLRRSLSTY KN	ECLRRSLSTY KY
39	ATDR CCFVHDCCY	ATDR CCFVHDCCY	95	CLRRSLSTY KNE	CLRRSLSTY KYG
40	TDR CCFVHDCCY	TDR CCFVHDCCY	96	LRRSLSTY KNEY	LRRSLSTY KYGY
41	DR CCFVHDCCY	DR CCFVHDCCY	97	RRSLSTY KNEYM	RRSLSTY KYGYM
42	R CCFVHDCCY	R CCFVHDCCY	98	RSLSTY KNEYMF	RSLSTY KYGYMF
43	CC FVHDCCY	CC FVHDCCY	99	SLSTY KNEYMFY	SLSTY KYGYMFY
44	CF VHDCCY	CF VHDCCY	100	LSTY KNEYMFYP	LSTY KYGYMFYP
45	FV HDCY	FV HDCY	101	STY KNEYMFYPD	STY KYGYMFYPD
46	VH DCY	VH DCY	102	TY KNEYMFYPDS	TY KYGYMFYPDS
47	HD CCY	HD CCY	103	Y KNEYMFYPDSR	Y KYGYMFYPDSR
48	DC Y	DC Y	104	K NEYMFYPDSRC	K YGYMFYPDSRC
49	CC Y	CC Y	105	NEYMFYPDSRCR	YGYMFYPDSRCR
50	CY GKLAKCNTK	CY GKLAKCNTK	106	EYMFYPDSRCRE	GYMFYPDSRCRG
51	YG LAKCNTKWD	YG LAKCNTKWD	107		EYMFYPDSRCRG
52	G LAKCNTKWDI	G LAKCNTKWDI	108	YMFYPDSRC REP	YMFYPDSRC RGEP
53	KL AKCNTKWDIY	KL AKCNTKWDIY	109	MFYPDSRC REPS	MFYPDSRC RGPS
54	L AKCNTKWDIYR	L AKCNTKWDIYP	110	FYPDSRC REPSE	FYPDSRC RGPSE
55	AK CNTKWDIYRY	AK CNTKWDIYPY	111	YPDSRC REPSET	YPDSRC RGPSET
56	K CNTKWDIYRYS	K CNTKWDIYPYS	112	PDSRC REPSETC	PDSRC RGPSETC

4.6.2 Conjugação de CA ou CNF à Fosfatase Alcalina

A preparação dos conjugados CA-Fosfatase Alcalina (CA-FA) e CNF-Fosfatase Alcalina (CNF-FA), foi baseada no protocolo de conjugação de anticorpos descrita por Harlow e Lane (1988).

Dois (2) mg de CA ou de CNF e 1 mg de fosfatase alcalina (SIGMA - P-3833) foram ressuspensos em 1 mL de PBS. À mistura foram adicionados 10 µL de uma solução 1% de glutaraldeído grau EM 50% (SIGMA), e mantida sob agitação por 5 min. Após incubação por 3h a temperatura ambiente, protegida da luz, adicionou-se 20 µL de etanolamina pH 7 à mistura. Incubou-se por 2 h a temperatura ambiente. Dializou-se contra PBS a 4 °C por 12 h. Após centrifugação a 14.000 rpm por 5 min sob refrigeração, coletou-se o sobrenadante contendo o conjugado e neste foram adicionados glicerol 50%, 1 mM de ZnCl₂, 1 mM de MgCl₂ e 0,02% azida de sódio. O conjugado foi estocado a 4 °C. A ligação da fosfatase alcalina à CA ou CNF foi confirmada através de ELISA.

4.6.3 ELISA para teste dos conjugados

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 10 µg/mL CB (mistura de isoformas) e incubadas a 37°C por 4h .

As placas foram bloqueadas com solução de caseína 2% em PBS por 1 h a 37 °C. Adicionou-se 10 µg/mL de CA-FA, CNF-FA ou FA em T-PBS (PBS com 0,05% de Tween 20) e incubou-se a 37 °C por 1 h. A cada poço foram adicionados 20µl de substrato (5 mg de paranitrofenilfosfato (pnPP) em 5 mL de Tris-HCl 1 M pH

9,8 contendo $MgCl_2$ 0,3 mM). Após desenvolvimento da cor, a reação foi interrompida com 10 μ L de EDTA 0,1 M e a leitura foi realizada em leitor de ELISA Labsystems Multiskan MS (Uniscience do Brasil) em comprimento de onda de 405 nm.

4.6.4 Ensaio de ligação de CA ou CNF aos peptídeos lineares de CB

A membrana contendo os peptídeos imobilizados foi lavada por 3 vezes de 10 minutos com TBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,0), e em seguida incubada com tampão de saturação (TBS contendo 0,1% de Tween 20, 2% de glicerol, 2% de soro fetal bovino, 2% de caseína, 2% de polivinil-polipirrolidona) contendo 5% de sacarose, sob agitação a temperatura ambiente por cerca de 12 h. Após 3 lavagens de 10 min a temperatura ambiente com T-TBS (TBS contendo 0,05% de Tween 20) a membrana foi incubada com o conjugado (CA-FA ou CNF-FA) em tampão de saturação por 90 min a 37 °C sob agitação. Em seguida lavou-se por 3 vezes de 10 min com T-TBS, e novamente por 3 vezes de 10 min com CBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, ácido cítrico monohidratado 10 mM, pH 7,0).

A ligação dos conjugados CA-FA ou CNF-FA à membrana foi revelada pela adição do substrato BCIP-MTT em CBS, seguida de incubação sob agitação a temperatura ambiente num intervalo de 1 a 30 min, até o aparecimento de um precipitado azul. A reação foi interrompida lavando-se a membrana com água ultrapura. A membrana foi digitalizada para análise posterior.

A regeneração da membrana foi feita lavando-se com DMF (dimetilformamida) por 3 vezes de 10 min a temperatura ambiente, seguida por 3 lavagens durante 2 min com água ultrapura. Foram feitas mais 3 lavagens de 10 min à temperatura ambiente com os seguintes reagentes, nesta ordem: Reagente A (8 M uréia, SDS 10%) contendo 0,1% de β -mercaptoetanol, reagente B (etanol 50%, ácido acético 10%) e metanol.

Foram feitos experimentos com 3 concentrações dos conjugados (CA-FA e CNF-FA): 1, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$. A intensidade dos pontos, chamada de sinal (S), foi determinada através do software NIH-Image (Molina et al., 1996) em uma escala de valores arbitrários. A intensidade relativa foi calculada tomando o ponto de maior coloração como 100%, em cada experimento. Dos valores de intensidade relativa obtidos, foi feita a média de todos os valores menores que 10%. Essa média, chamada ruído (R), foi usada para dividir todos os valores de intensidade real, dando origem à razão sinal/ruído (S/R). Os resultados foram analisados através de gráficos da razão de S/R em função do número do peptídeo. Valores de corte de 4, 5 ou 10 S/R foram usados, dependendo do experimento.

Para identificação dos agrupamentos de peptídeos reativos, consideraram-se as seqüências de aminoácidos que apresentaram reatividade em pelo menos 3 spots em seqüência na membrana e que tenham sido observadas em todos os experimentos feitos nas diferentes concentrações do ligante (CA ou CNF). Dentro de cada agrupamento reativo foram identificadas as seqüências mínimas de peptídeos reativas (SMPR). Tais seqüências representam os resíduos de aminoácidos que estão presentes em todos os peptídeos de um grupo com um número mínimo de 3 peptídeos ($n \geq 3$).

4.6.4 Ensaios de Competição

4.6.5.1 Ensaio com elevada concentração de sal

O experimento foi feito com CA-FA ou CNF-FA nas mesmas condições descritas no item 4.6.3, porém alterou-se a concentração de NaCl, de 150 mM para 500 mM nos tampões de saturação, TBS e T-TBS.

4.6.5.2 Ensaio de competição entre o conjugado e a proteína livre.

Foram incubados, ao mesmo tempo, a membrana, o conjugado e um excesso molar de 100X da proteína homóloga livre em relação ao conjugado. Todos os outros passos foram feitos essencialmente como descrito no item 4.6.3.

4.6.5.3 Competição entre CA e CNF

A membrana foi incubada com CA-FA ou CNF-FA na presença simultânea de um excesso molar de 10X de CNF ou CA não marcados, respectivamente. Todos os outros passos foram feitos essencialmente como descrito no item 4.6.3.

4.7 Identificação das prováveis regiões de interação entre CA/CB e CNF/CB em um modelo tridimensional das isoformas

As seqüências de CB1 e CB2 foram submetidas à análise por homologia de seqüência no sítio Swiss-Model, disponível na rede internacional de computadores no endereço <http://www.expasy.ch/swissmodel/SWISS-MODEL.html>. Esse servidor, forneceu um modelo de estrutura tridimensional baseado na homologia da seqüência de aminoácidos das proteínas submetidas com outras proteínas, armazenadas em bancos de dados, cujas estruturas terciárias já foram elucidadas.

O arquivo com o resultado da análise de homologia, enviado pelo Swiss-Model, foi examinado usando o programa Rasmol. No modelo da estrutura tridimensional obtida para cada isoforma, foram identificadas as SMPR encontradas nos experimentos de spot para CA e CNF.

5 . Resultados

5.1 Purificação de CNF

A focalização isoelétrica mostrou-se uma técnica eficiente como primeira etapa do processo de purificação de CNF. O gel da figura 4A apresenta os resultados, da análise por SDS-PAGE, de amostras obtidas de uma focalização feita a partir do plasma total. Observa-se que CNF está concentrado principalmente na faixa de pH que varia de 3,5 à 5,0, variando o grau de pureza de acordo com o pH. As amostras contendo CNF parcialmente purificado podem ser agrupadas e refocalizadas, o que permite a obtenção de um produto de melhor qualidade quanto à sua pureza. A purificação subsequente em coluna de afinidade das amostras parcialmente purificadas da focalização isoelétrica permitiu a obtenção de bons resultados em termos de pureza sem comprometimento da atividade (Fig 4B).

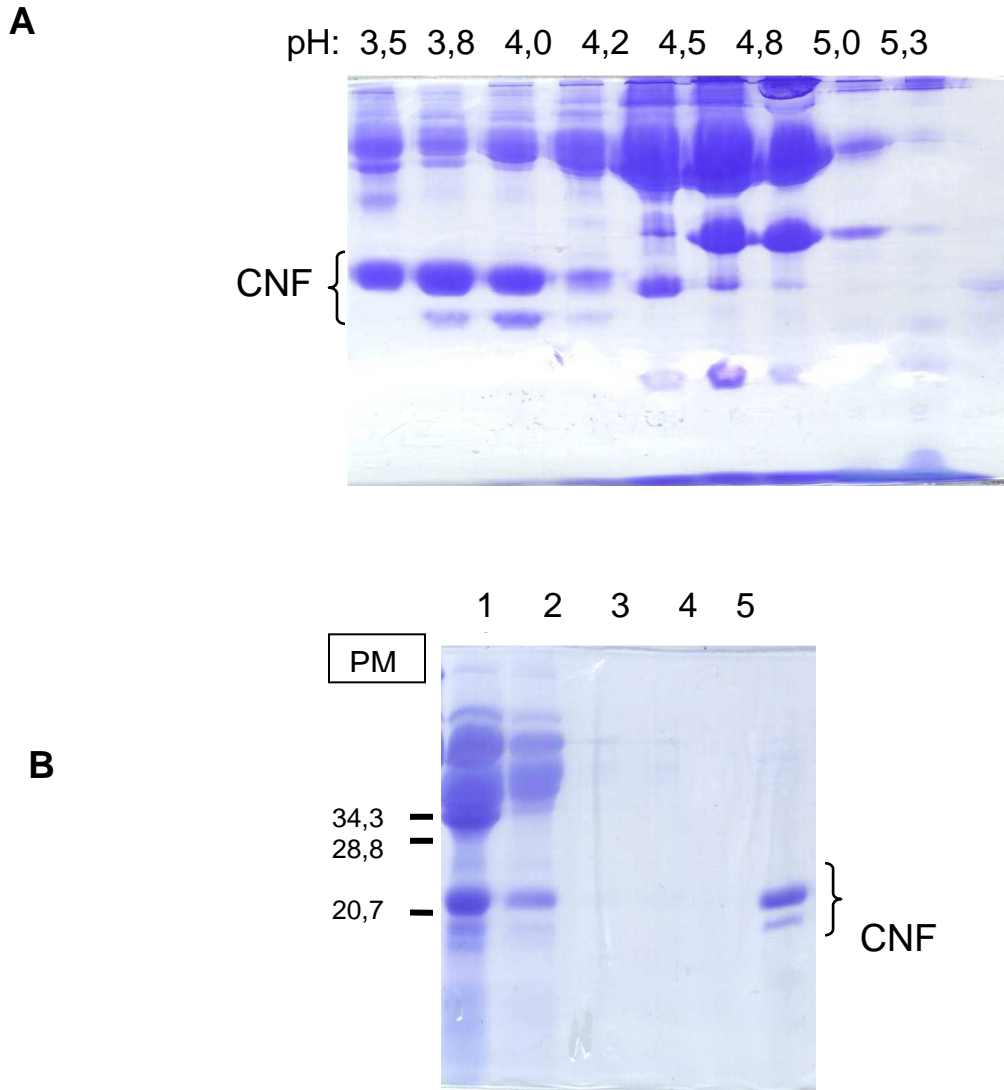


Figura 4 – Perfil eletroforético das frações obtidas no processo de purificação de CNF a partir do plasma de *C. d. terrificus*

A) SDS-PAGE a 12,5%, corado por azul de Comassie, das frações obtidas por focalização isoeétrica do plasma de *Crotalus durissus terrificus*. Os pHs das frações foram medidos em potenciômetro e estão indicados no topo de cada canaleta onde foi aplicado. A chave seleciona as bandas referentes ao CNF.

B) SDS-PAGE a 12,5%, corado por azul de Comassie, das frações eluidas da cromatografia em coluna de afinidade CB-Sepharose. Canaleta 1, amostra de CNF parcialmente purificado aplicada na coluna. Canaletas 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem ao produto obtido da eluição em tampão fosfato-citrato nos pHs, 7,4; 6,0; 5,0; 4,0 e 2,85 respectivamente. A chave seleciona as bandas referentes ao CNF. PM se refere às bandas do padrão de peso molecular utilizado.

5.2 Determinação da presença de açúcares e sua influência na atividade de CNF

Após a purificação de CNF por cromatografia de afinidade, observou-se a presença de duas bandas na eletroforese em gel na presença de SDS (fig. 4B). Uma vez que CNF possui um possível sítio de glicosilação, Asn¹⁵⁷, testou-se a ação de enzimas capazes de retirar oligossacarídicos ligados a proteínas.

A análise, em SDS-PAGE, de CNF após tratamento com as enzimas deglicosilantes NANase II, GALase III, HEXase I e O-Glycosidase DS, mostrou que, o seu perfil eletroforético de dois componentes com massa molecular de 23 kDa e 18 kDa se manteve, tanto na ausência quanto na presença de agentes desnaturantes (dados não mostrados). Já CNF tratado com PNGase-F, apresentou apenas uma banda de cerca de 18 kDa (fig. 5), quer na presença ou ausência de agente desnaturante. Como PNGase F é uma enzima capaz de clivar oligossacarídeos Asn-ligados, estes resultados confirmam a presença de um açúcar provavelmente ligado ao resíduo de Asn¹⁵⁷ (FORTES-DIAS et al., 1994). Com este resultado conclui-se que CNF está presente no plasma da serpente como uma mistura das formas glicosilada e não glicosilada. Em todos os experimentos deste trabalho usou-se a preparação de CNF na forma como esta se encontra no plasma da serpente.

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos no teste de atividade fosfolipásica residual realizado com as amostras de CNF, tratadas ou não, com a enzima deglicosilante PNGaseF. Os resultados mostram portanto, que a deglicosilação não afetou a atividade inibidora de fosfolipase de CNF.

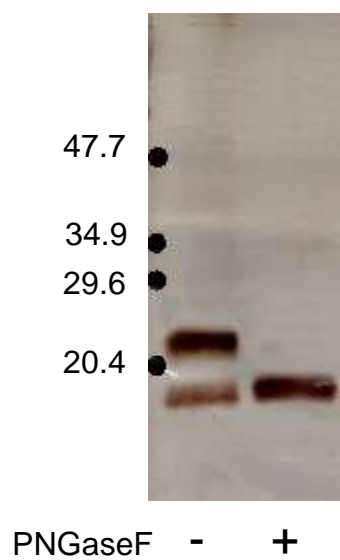


Figura 5 - Perfil eletroforético das amostras de CNF purificado antes e depois da deglicosilação
SDS-PAGE a 12,5% impregnado por prata, de CNF (2,5 µg/ canaleta) antes e após deglicosilação por PNGase F.

Tabela 4 - Atividade fosfolipásica residual do veneno crotálico (VC) na ausência e presença de CNF, com e sem tratamento com enzima deglicosilante (PNGaseF)

Condição testada	Diâmetro do halo (mm)	Atividade PLA ₂ residual (%)
VC	8,50 ± 0,14	100,0
VC + PNGaseF	8,50 ± 0,14	100,0
CNF + VC	6,80 ± 0,14	80,0
(CNF + PNGseF) + VC	6,85 ± 0,07	79,6

5.3 Marcação de CB₂

Trabalhos anteriores de “binding”, nos quais marcou-se radioativamente o complexo CA/CB, demonstraram que somente CB se liga à membrana sinaptossomal (BON e JENG, 1979; DEGN et al., 1991; KRIŽAJ et al., 1996). Considerando este fato, aliado à preferência de ligação de CNF pela isoforma CB₂ (FORTES-DIAS et al., 1994), optou-se por trabalhar com o complexo CA/CB₂, ao invés da crotoxina composta por várias isoformas, como é naturalmente encontrada na peçonha de *C. d. terrificus* (FAURE e BON, 1987). Para tanto, foi feita primeiro a marcação de CB₂, seguida da reconstituição do complexo

O produto da marcação foi aplicado à uma coluna de gel filtração Sephadex G-25. A purificação do complexo frio foi acompanhada através da absorbância das frações, e do complexo marcado, pela medida da radioatividade. Como mostra a figura 6, ambas as preparações apresentaram um perfil bastante semelhante, com o complexo sendo eluído entre 3,5 e 8,5 mL.

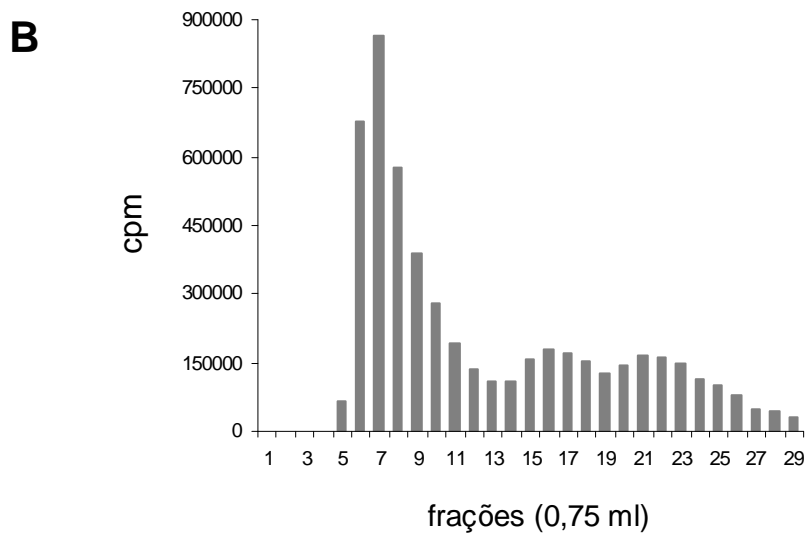
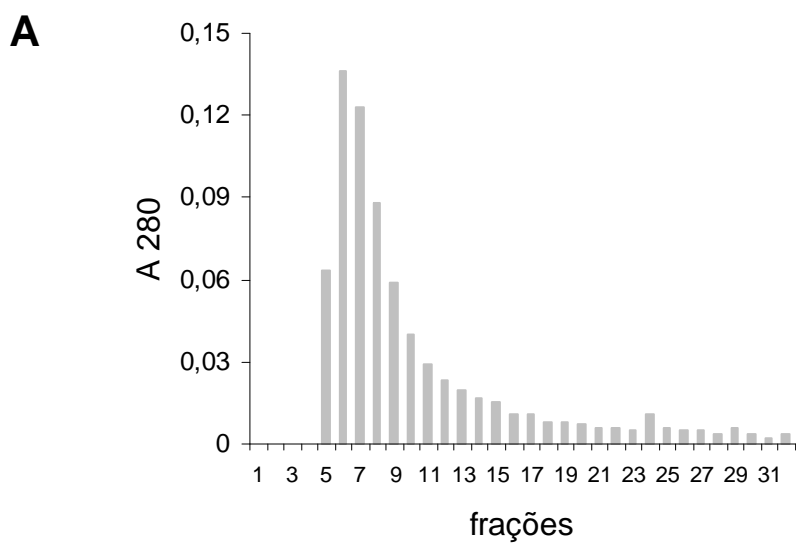


Figura 6 - Cromatograma da purificação do complexo CA-CB₂ e CA-¹²⁵ICB₂ em coluna de filtração molecular em Sephadex G-25.

A) Leitura da absorbância em comprimento em onda de 280nm das frações obtidas após aplicação, em coluna Sephadex G-25, do complexo formado CA-CB₂

B) Leitura da radioatividade das frações obtidas após, marcação de CB₂ com ¹²⁵I, formação do complexo CA-¹²⁵ICB₂ e aplicação em coluna Sephadex G-25

5.4 Experimentos de ligação

O sistema biológico usado neste trabalho, isto é, CA-¹²⁵ICB₂ como toxina e sinaptossoma de córtex cerebral de rato como tecido alvo para a sua ligação, foi primeiro validado. Para tanto, os resultados obtidos da curva de associação e competição pela ligação com a Ctx e suas subunidades não marcadas, usados neste sistema, foram comparados com resultados, já relatados na literatura, para sistemas análogos.

A curva de associação de CA-¹²⁵ICB₂ é apresentada na figura 7, onde se observa que CA-¹²⁵ICB₂ se liga ao sinaptossoma cérebro cortical de rato de maneira saturável, com um perfil semelhante ao encontrado em experimentos de ligação usando ¹²⁵ICtx total e sinaptossoma de cérebro de cobaia (DEGN et al. 1991) ou membranas pré-sinápticas de órgão elétrico de *Torpedo marmorata* (KRIŽAJ et al., 1997). Os experimentos de cinética da ligação de CA-¹²⁵ICB₂ (fig. 8), demonstraram que o equilíbrio de ligação foi alcançado após 40 minutos. Em experimentos com sinaptossoma de cobaia, Degn et al. (1991) encontraram um tempo de equilíbrio de ligação da crotoxina marcada de cerca de 45 min.

Os resultados de inibição da ligação de CA-¹²⁵ICB₂ pelo complexo frio, e por cada subunidade do complexo isoladamente (Fig. 9) seguiram o mesmo padrão já publicado para outras membranas neuronais (DEGN et al. 1991; KRIŽAJ et al., 1996; KRIŽAJ et al., 1997). CA-CB₂ e CA foram capazes de inibir completamente a ligação de CA-¹²⁵ICB₂ ao sinaptossoma de cérebro de rato, de maneira dose dependente, com valores de IC₅₀ de 16 nM e 97 nM, respectivamente. CB₂ foi capaz de inibir a ligação de CA-¹²⁵ICB₂ ao sinaptossoma de maneira dose dependente apenas em concentrações intermediárias (10⁻⁸ nM a 5 x 10⁻⁷ nM). Após essa

concentração houve uma tendência de aumento da ligação específica de CA-¹²⁵ICB₂. Este efeito paradoxal apresentado por CB₂ também foi verificado anteriormente em outros sistemas (DEGN et al. 1991; KRIŽAJ et al., 1996; KRIŽAJ et al., 1997). Na tabela 5 está representado um esquema das reações de competição considerando cada um dos competidores apresentados na figura 9.

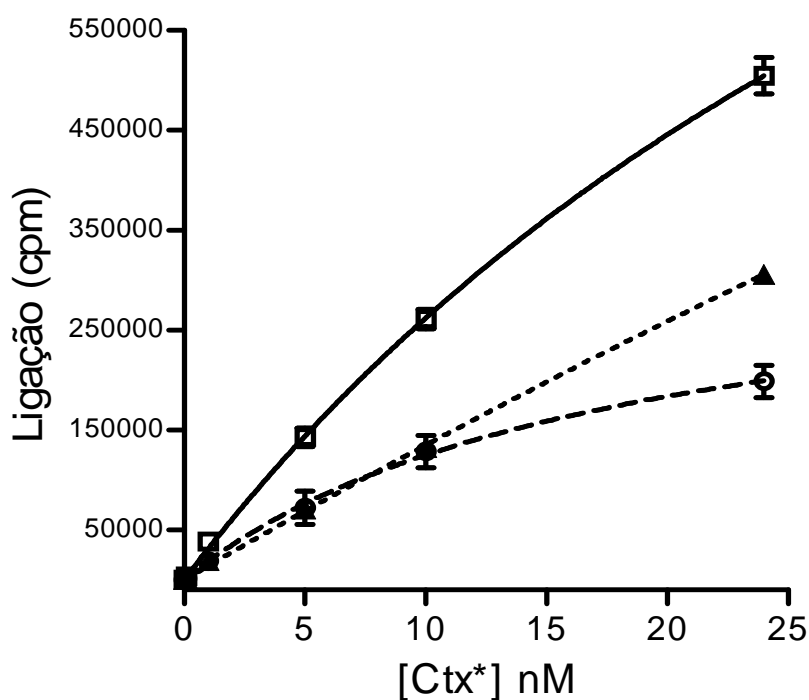


Figura 7 - Curva de associação de CA-¹²⁵ICB₂ à sinaptossoma cérebro cortical de rato.

A ligação de diferentes concentrações de CA-¹²⁵ICB₂ (ligação total) foi avaliada por 1 h a 37°C. Para cada concentração de CA-¹²⁵ICB₂ foi feito um ponto com CA/CB₂ não marcado 1000 vezes mais concentrado que o complexo marcado (ligação não específica). A ligação específica foi obtida pela diferença entre a ligação total e a não específica. Símbolos: □ ligação total; ▲ ligação não específica; ○ ligação específica. Os valores estão expressos pela média ± desvio padrão de triplicatas.

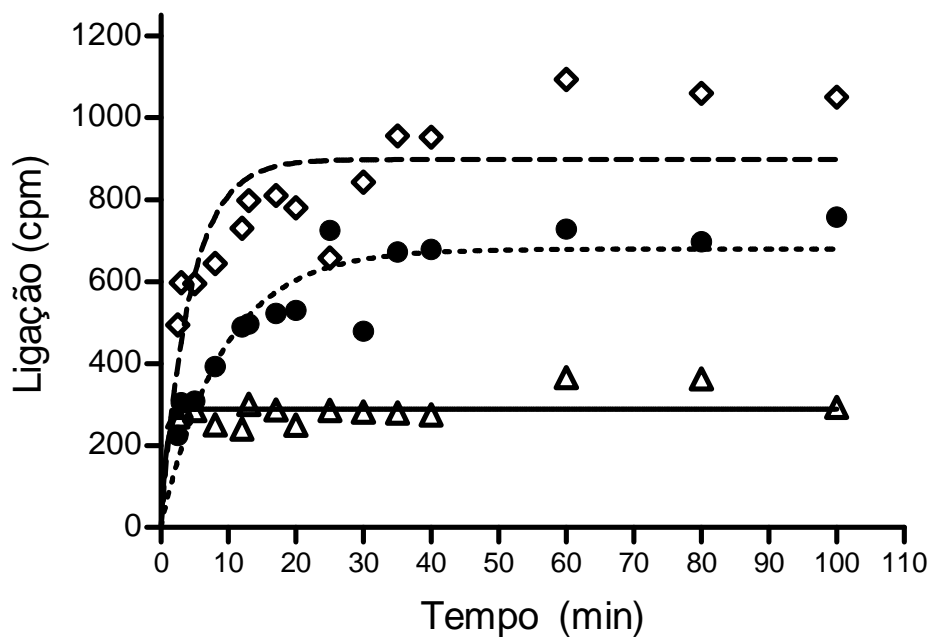


Figura 8 - Cinética de ligação de CA-¹²⁵ICB₂ a sinaptossomas cérebro cortical de rato

A ligação de CA-¹²⁵ICB₂ (10⁻¹⁰ M) ao sinaptossoma (ligação total), a 37 °C, foi avaliada em diferentes intervalos de tempo de incubação. Para a ligação não específica foram incubados 10⁻¹⁰ M de CA-¹²⁵ICB₂ e 10⁻⁶ M de CA-CB₂, para cada intervalo de tempo. A ligação específica foi obtida pela diferença entre a ligação total e a não específica. Símbolos: (◇) ligação total; (Δ) ligação não específica; (●) ligação específica

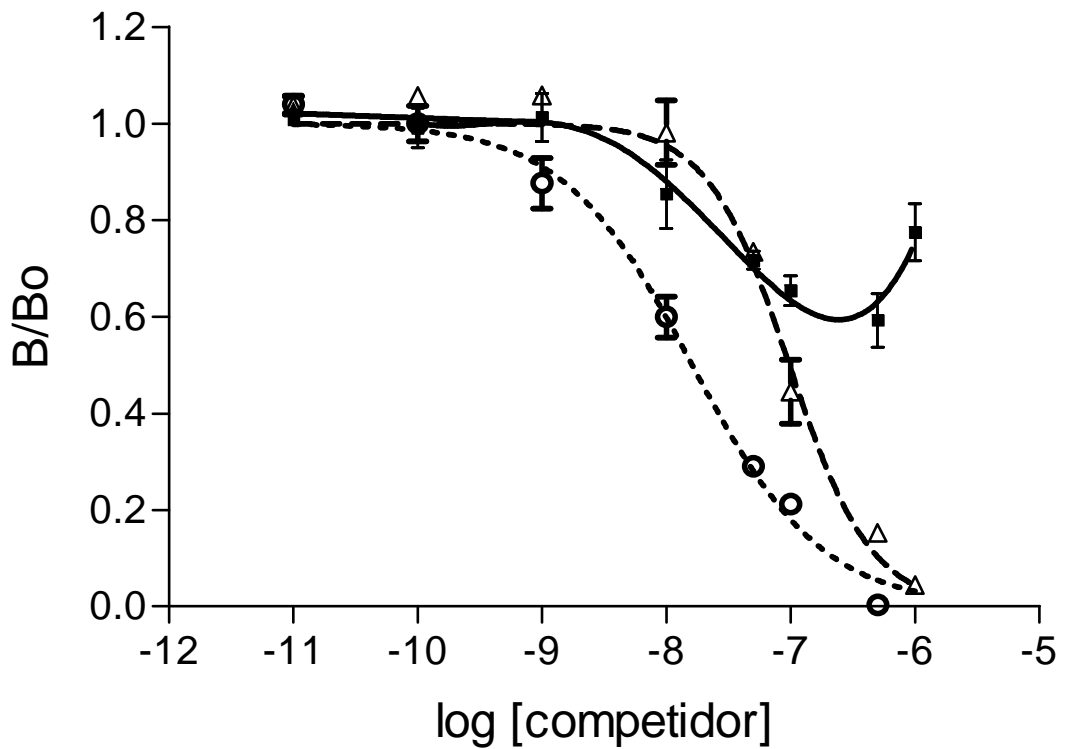


Figura 9 - Inibição da ligação específica de CA-¹²⁵ICB₂ à sinaptossoma cérebro cortical de rato pelo complexo não marcado ou seus componentes isolados.

A ligação aos sinaptossomas, de 10⁻¹⁰ M de CA-¹²⁵ICB₂, por 1 h a 37 °C, foi avaliada na presença de diferentes concentrações de CA/CB₂ ou dos competidores (CA ou CB₂). B₀ é a concentração de CA-¹²⁵ICB₂ ligado na ausência de competidor, B é a concentração de CA-¹²⁵ICB₂ ligado na presença de uma concentração específica do competidor. Símbolos: (○) CA-CB₂, (△) CA e (■) CB₂. Os valores estão expressos pela média ± desvio padrão de triplicatas.

Tabela 5 - Reações de competição entre CA-¹²⁵ICB₂, CACB, CA e CB, pela ligação a sinaptossomas (S) cérebro corticais de rato

Competidor	Reações
CACA	$CA^*CB + S \rightleftharpoons S^*CB + CA$ $S^*CB + CACB \rightleftharpoons S^*CB + CA$
CA	$CA^*CB + S \rightleftharpoons S^*CB + CA$ $S^*CB + CA \rightleftharpoons S + CA^*CB$
CB	$CA^*CB + S \rightleftharpoons S^*CB + CA \quad CB$ $S^*CB + CB \rightleftharpoons SCB + ^*CB + CB \rightleftharpoons S^*CB + (CB)_n \text{ ou } (^*CBCB)$

S = Sinaptossoma

*CB = ¹²⁵ICB₂

5.4.1 Competição da ligação de CA-¹²⁵ICB₂ por CNF

Uma vez que o sistema já estava validado, a ação de CNF sobre a ligação de CA-¹²⁵ICB₂ ao sinaptossoma passou a ser avaliada. Primeiramente, foi usada uma concentração fixa da toxina marcada (10^{-10} nM) e uma concentração de CNF 10^4 vezes maior, variando-se a ordem de adição dos reagentes (CNF, CA-¹²⁵ICB₂ e tecido) na incubação. Tomou-se como controle, a ligação de CA-¹²⁵ICB₂ na ausência de CNF. Como apresentado na figura 10, CNF foi capaz de inibir a ligação de CA-¹²⁵ICB₂ ao tecido, e o percentual desta inibição foi dependente da condição testada. Na concentração de CNF usada, observou-se uma maior inibição da ligação de CA-¹²⁵ICB₂ quando este foi previamente incubado com o inibidor. Quando foram adicionados ao mesmo tempo CA-¹²⁵ICB₂, CNF e o tecido e quando CNF foi previamente incubado com o tecido, obtiveram-se resultados de inibição intermediários. A menor taxa de inibição da ligação da Ctx foi observada quando se incubou CA-¹²⁵ICB₂ e o tecido, antes da adição do inibidor, ou seja, após a ligação de CA-¹²⁵ICB₂ ao sítio alvo.

Uma vez comprovada a influência de CNF sobre a ligação de CA-¹²⁵ICB₂ ao sinaptossoma, usou-se uma concentração fixa de CA-¹²⁵ICB₂ e concentrações crescentes de CNF, para se obter curvas de inibição. A escala de adição dos reagentes está resumida na tabela 6 (B a D). A competição de CA-¹²⁵ICB₂ pelo complexo frio foi feita em paralelo e tomada como referência (tabela 6 A). CNF mostrou-se capaz de inibir a ligação da toxina marcada, de maneira dose dependente (Fig. 11), confirmando os resultados obtidos no experimento anterior. Quando CNF foi incubado simultaneamente com CA-¹²⁵ICB₂ e sinaptossoma (tabela 6 B) encontrou-se um IC₅₀ de 100 nM, valor este muito próximo daquele determinado

para CA como competidor (97 nM) (Fig. 9). A pré-incubação de CA-¹²⁵ICB₂ e CNF seguida da adição do sinaptossoma (tabela 6 D), reduziu a razão inicial B/Bo para 60% (Fig. 11), com um IC₅₀ de 25 nM.

Quando a toxina marcada já havia se ligado ao sinaptossoma (tabela 6 C), o deslocamento por CNF foi parcial, alcançando um máximo de 45%, mesmo na maior concentração testada do competidor (1μM). Nesse caso, CA-¹²⁵ICB₂ já havia alcançado o equilíbrio de ligação ao sinaptossoma quando CNF foi adicionado. O inibidor teria, portanto, que deslocar CB do seu sítio de ligação.

Considerando a hipótese de esta inibição pouco pronunciada ser devido à tempo de contato insuficiente entre CNF e ¹²⁵ICB₂ ligado ao tecido, acompanhou-se a cinética de dissociação. Após incubação de CA-¹²⁵ICB₂ e tecido por 40min, CNF foi adicionado e alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo de 0 a 3 h de incubação. A figura 12 confirma que CNF foi capaz de deslocar parcialmente (40%) ¹²⁵ICB₂ já ligado ao sinaptossoma.

As curvas de saturação para a ligação da toxina marcada ao sinaptossoma, na presença de CA-CB₂ ou CNF como competidores, são apresentadas na figura 13. Constantes de dissociação no equilíbrio (k_d) de 1,2 ± 0,3 nM e 3,2 ± 1,2 nM foram encontradas para CA-CB₂ e CNF, respectivamente.

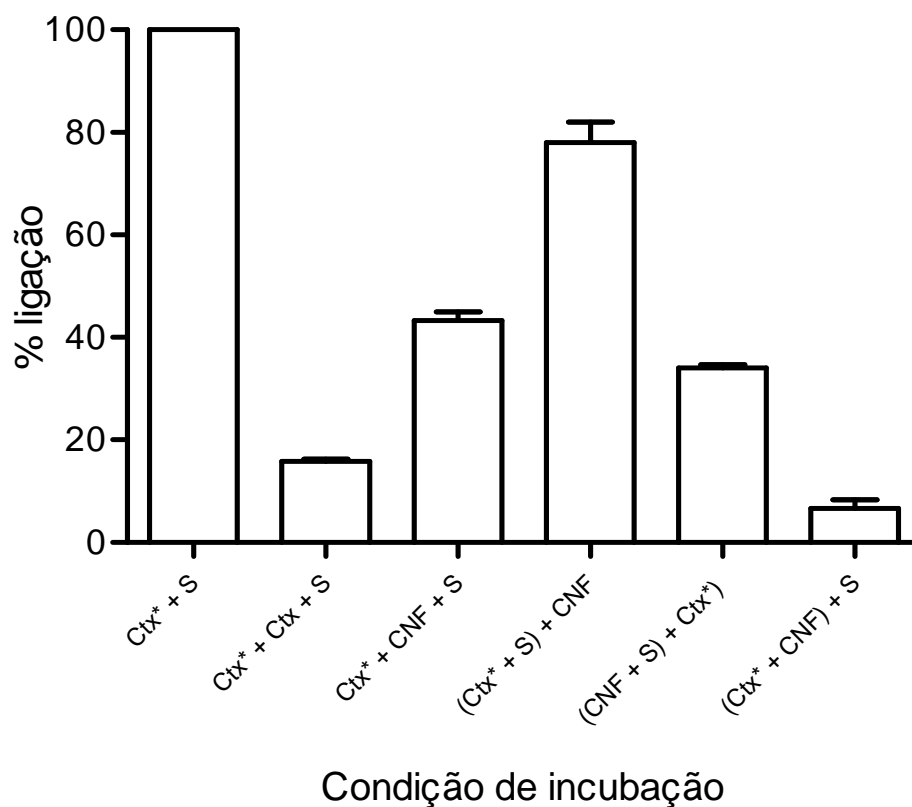


Figura 10 - Avaliação preliminar do efeito de CNF na ligação de CA-¹²⁵ICB₂ a sinaptossomas cérebro corticais de rato.

Cncentrações finais de 10⁻¹⁰ M de CA-¹²⁵ICB₂ (Ctx*), 10⁻⁶ M de CNF e 10⁻⁷ M de CA/CB₂ (Ctx) foram incubadas com os sinaptossomas(S) nas seguintes condições de incubação na ordem em que são representados no gráfico:

- Ctx* + S (ligação total) incubados por 1h a 37°C,
- Ctx* + Ctx + S incubados por 1 h a 37 °C
- Ctx* +CNF + S incubados por 1 h a 37 °C.
- Ctx* + S incubados por 1 h a 37 °C, + CNF, incubação por mais 1 h a 37 °C.
- CNF +S incubados por 1 h a 37 °C, + Ctx*, incubação por mais 1 h a 37 °C.
- Ctx* + CNF incubados por 1 h a 37 °C, + S, incubação por mais 1 h a 37 °C.

Tabela 6 - Condições de incubação e IC₅₀ dos experimentos de “binding” de CA-¹²⁵ICB₂ à sinaptossoma de cérebro de rato (S), na presença de CA-CB₂ ou CNF como competidores

Condição	Reações e tempo de incubação	IC ₅₀ nM	K _d nM
A	$\text{CA-}^{125}\text{ICB}_2 + \text{S} + \text{CA-CB}_2 \xrightleftharpoons[2\text{ h}]{} \text{S-}^{125}\text{ICB}_2 + \text{S-CB}_2 + \text{CA}$	8	1,2 ± 0,3
B	$\text{CA-}^{125}\text{ICB}_2 + \text{S} + \text{CNF} \xrightleftharpoons[2\text{ h}]{} \text{S-}^{125}\text{ICB}_2 + \text{CNF-}^{125}\text{ICB}_2 + \text{CA}$	100	3,2 ± 1,2
C	$\text{CA-}^{125}\text{ICB}_2 + \text{S} \xrightleftharpoons[1\text{ h}]{} \text{S-}^{125}\text{ICB}_2 + \text{CA} \xrightleftharpoons[1\text{ h}]^{+\text{CNF}} \text{CNF-}^{125}\text{ICB}_2 + \text{S-}^{125}\text{ICB}_2 + \text{CA}$	1200 ⁽¹⁾	n. d.
D	$\text{CA-}^{125}\text{ICB}_2 + \text{CNF} \xrightleftharpoons[1\text{ h}]{} \text{CNF-}^{125}\text{ICB}_2 + \text{CA} \xrightleftharpoons[1\text{ h}]^{+\text{S}} \text{CNF-}^{125}\text{ICB}_2 + \text{S-}^{125}\text{ICB}_2 + \text{CA}$	25	n. d.

⁽¹⁾ Valor foi obtido por extrapolação da curva correspondente (C) da figura 11

n. d. = não determinado

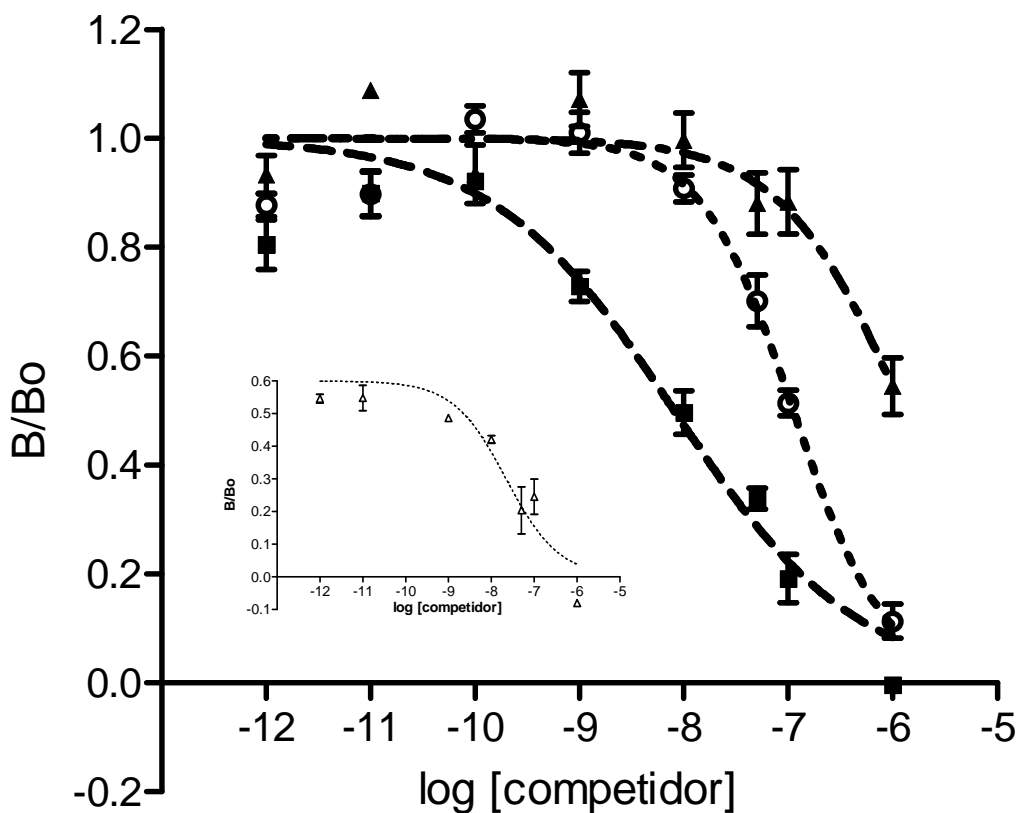


Figura 11 - Inibição da ligação específica de $CA^{-125}ICB_2$ a sinaptossomas (S) por CNF.

A ligação de 10^{-10} M de $CA^{-125}ICB_2$ a sinpatossomas foi avaliada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ na presença de concentrações crescentes de $CA-CB_2$ ou CNF em diferentes condições de incubação. B_0 é a concentração de $CA^{-125}ICB_2$ ligada na ausência de competidor, B é a concentração de $CA^{-125}ICB_2$ ligada na presença do competidor em uma concentração específica. Símbolos e ordem de incubação dos reagentes: (■)[$CA^{-125}ICB_2 + S + CA-CB_2$] (2 h); (O)[$CA^{-125}ICB_2 + S + CNF$] (2 h); (▲)[$CA^{-125}ICB_2 + S$] (1 h), adição de CNF (1 h); (Δ) [$CA^{-125}ICB_2 + CNF$] (1 h), adição de S (1 h). Os valores estão expressos pela média \pm desvio padrão de triplicatas.

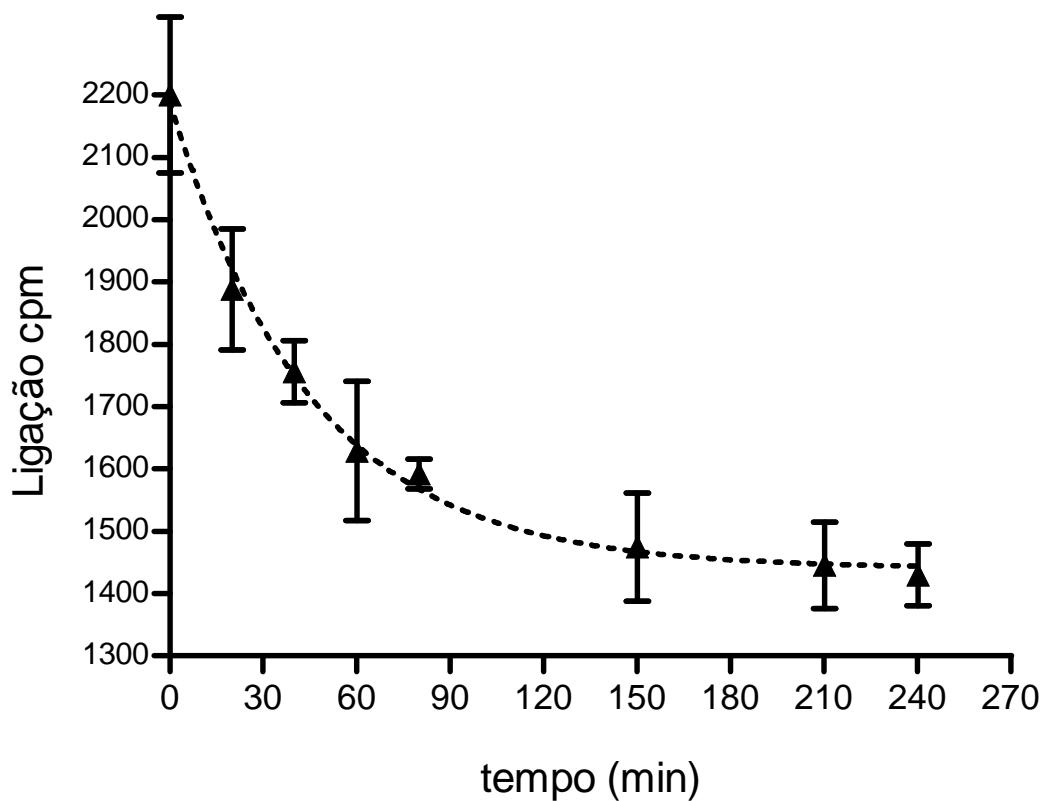


Figura 12 - Deslocamento de CA-¹²⁵ICB₂, ligado ao sinaptossoma, por CNF
 Após incubação de 10⁻¹⁰ M de CA-¹²⁵ICB₂ e sinaptossomas por 45 min a 37 °C, 10⁻⁶ M de CNF foram adicionados e incubados novamente a 37 °C. Alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo. Os valores estão expressos pela média ± desvio padrão de triplicatas.

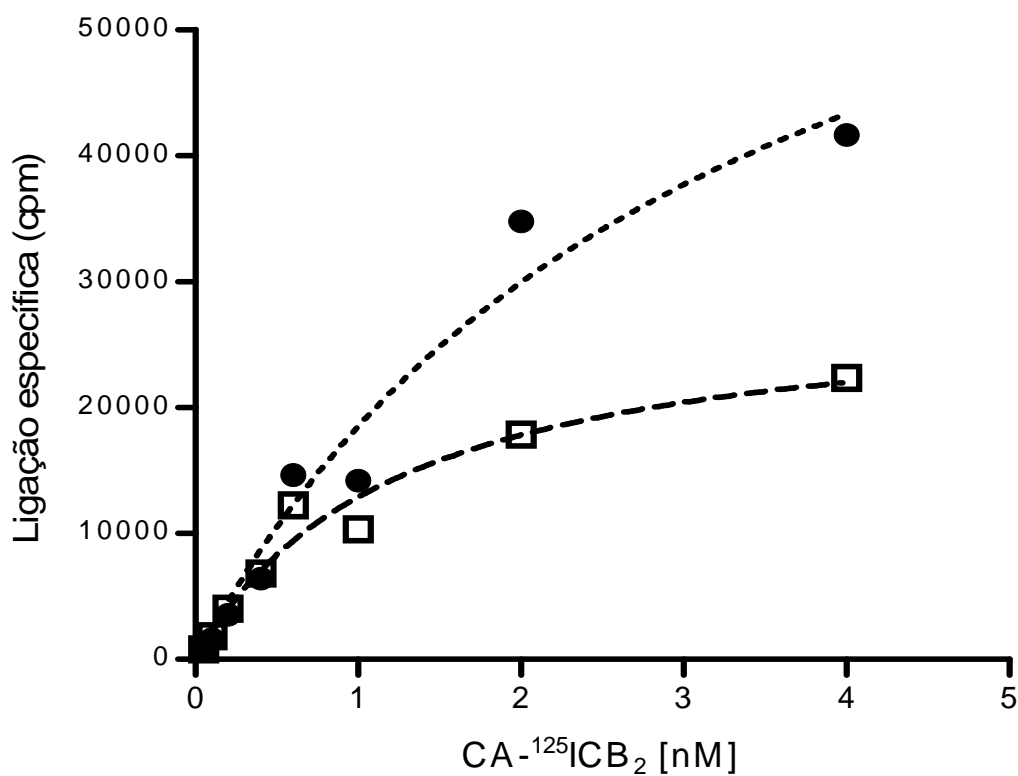


Figura 13 - Curva de saturação para ligação de CA-¹²⁵ICB₂ a sinaptossoma na presença de CA-CB₂ e CNF como competidores.

Diferentes concentrações de CA-¹²⁵ICB₂, na presença de um excesso de 1000 vezes de CA-CB₂ ou CNF e 1µg de sinaptossoma, foram incubados por 1 h a 37 °C. Símbolos: (□) CA-CB₂ e (●) CNF. Os valores estão expressos como a média ± desvio padrão de triplicatas.

5.5 Ligação de CA-FA e CNF-FA aos peptídeos lineares de CB₁ e CB₂

Para confirmação da conjugação da FA alcalina à CA e CNF foram feitos ELISAS, nos quais as placas foram sensibilizadas com CB. Nos testes para avaliar a conjugação de CNF-FA, a média de leituras absorvância foi de 1,085 e 0,309 para CNF-FA e FA, respectivamente. No caso de CA-FA as leituras encontradas foram de 1,678 e 0,356 para CA-FA e FA, respectivamente.

O resultado da ligação de CA-FA e CNF-FA aos peptídeos lineares de CB₁ e CB₂ imobilizados em membrana é exemplificado na figura 14. Após digitalização da mesma e cálculo da intensidade dos pontos, os gráficos resultantes são apresentados em duas formas:

- 1) em valores arbitrários de intensidade, figuras 15 e 17 para CA-FA e CNF-FA, respectivamente;
- 2) razão sinal/ruído (S/R), figuras 16 para CA-FA e 18 para CNF-FA. A partir dos resultados obtidos nas diferentes concentrações dos conjugados, identificaram-se os agrupamentos de peptídeos reativos e dentro destes, as seqüências mínimas de peptídeos reativas (SMPR) na estrutura primária de CB₁ e CB₂ (fig. 19).

5.5.1 Ligação de CA-FA aos peptídeos lineares de CB₁ e CB₂

Três agrupamentos reativos foram encontrados em CB₁ (fig. 19), contendo cinco SMPR: SMPR 1 (G²⁹- R³³), SMPR 2 (H⁴⁷ - K⁵⁶), SMPR 3 (I⁶³-S⁶⁷), SMPR 4 (S⁷⁰-K⁷⁷) e SMPR 5 (G¹⁰⁶ - R¹¹⁶).

Dois dos três agrupamentos reativos de CB₁ (1 e 2), foram mantidos para CB₂. As SMPR 1, 2 e 4, com pequenas modificações, também foram encontradas para CB₂, mas não as SMPR 3 e 5.

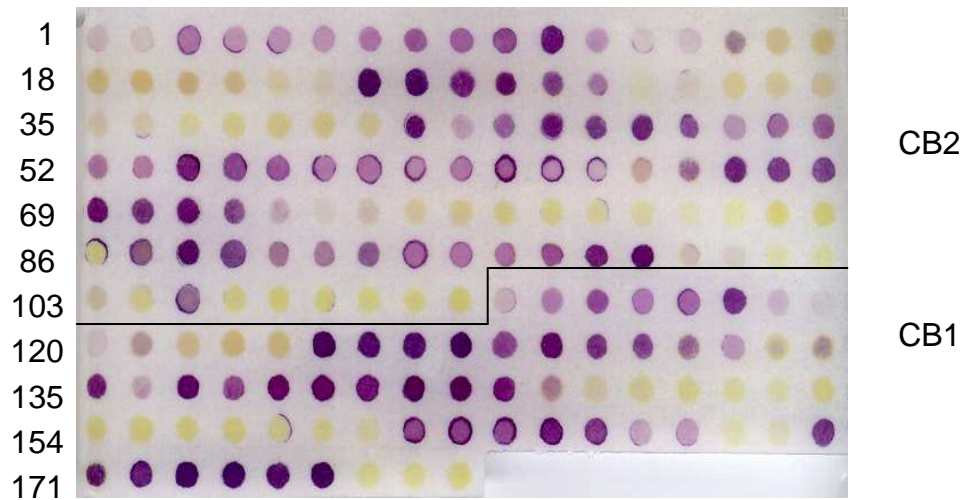
Comparando-se dos resultados de CB₁ e CB₂ (fig.19), observa-se que substituições de resíduos de aminoácidos estão presentes em 3 das 5 SMPR. A substituição de R³³/Q³³, aparentemente, teve pouca influência na reatividade da SMPR 1. Na SMPR 3, P⁶⁵ em CB₁ é substituído por R⁶⁵ em CB₂, e esta região apresentou reatividade apenas na isoforma de CB₁. A última SMPR, próxima à porção carboxiterminal de CB₁, contém 3 substituições de resíduos de aminoácidos: Y¹⁰⁵/N¹⁰⁵, G¹⁰⁶/E¹⁰⁶ e G¹¹⁷/E¹¹⁷, com reatividade apenas em CB₁.

5.5.2 Ligação de CNF-FA aos peptídeos lineares de CB1 e CB2

Três agrupamentos reativos foram identificados em CB₁ e dois em CB₂. Em CB₁ foram identificadas as SMPR 6 (K¹⁵- Y²¹), SMPR 7 (Y²⁷ - R³³), SMPR 8 (W⁶¹- S⁶⁷), e SMPR 9 (L¹⁰⁰-R¹¹⁶). As SMPR 6 e 7 foram mantidas em CB₂ e apresentaram, respectivamente, diferenças de 1 e 2 resíduos de aminoácidos. A SMPR 8 em CB₁ foi antecipada em CB₂, mas ainda incluiu a substituição P⁶⁵/R⁶⁵, já SMPR 9, na porção C-terminal, não foi observada em CB₂.

O agrupamento 1 foi antecipado quando comparado com os resultados obtidos com CA-FA em CB₁ e CB₂. Esta nova região inclui as substituições I¹⁸/V¹⁸ e R³³/Q³³. A SMPR 9, exclusiva para CB₁, foi maior para CNF-FA quando comparada com a mesma região reativa para CA-FA.

CA-FA



CNF-FA

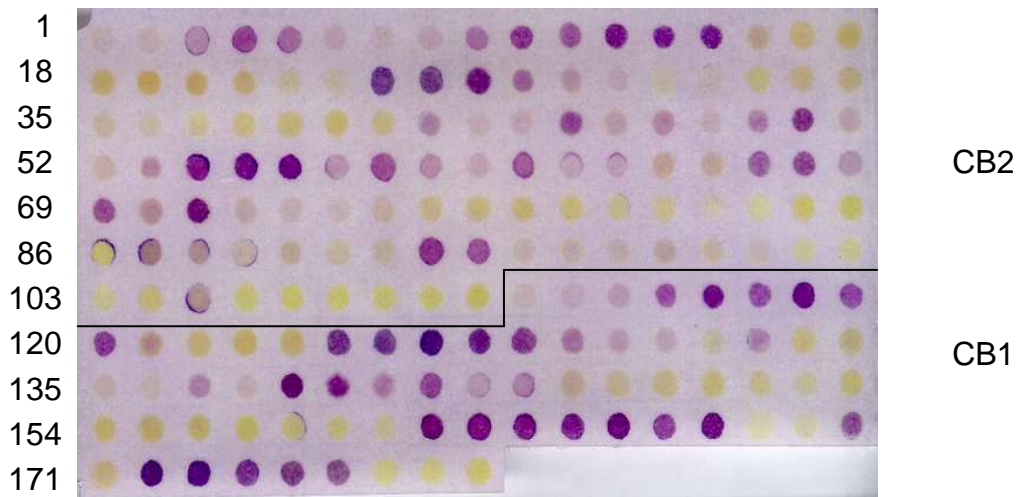


Figura 14 – Fotografia das membranas após ligação de CA-FA e CNF-FA na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Os pontos na parte superior e inferior à linha correspondem aos peptídeos das isoformas CB_2 e CB_1 , respectivamente. À esquerda da membrana está a numeração do primeiro peptídeo de cada linha. Cada spot representa um peptídeo, a coloração dos spots variando do rosa ao violeta escuro representam a ligação de CA-FA ou CNF-FA, e quanto mais escura (violeta) maior a intensidade de ligação.

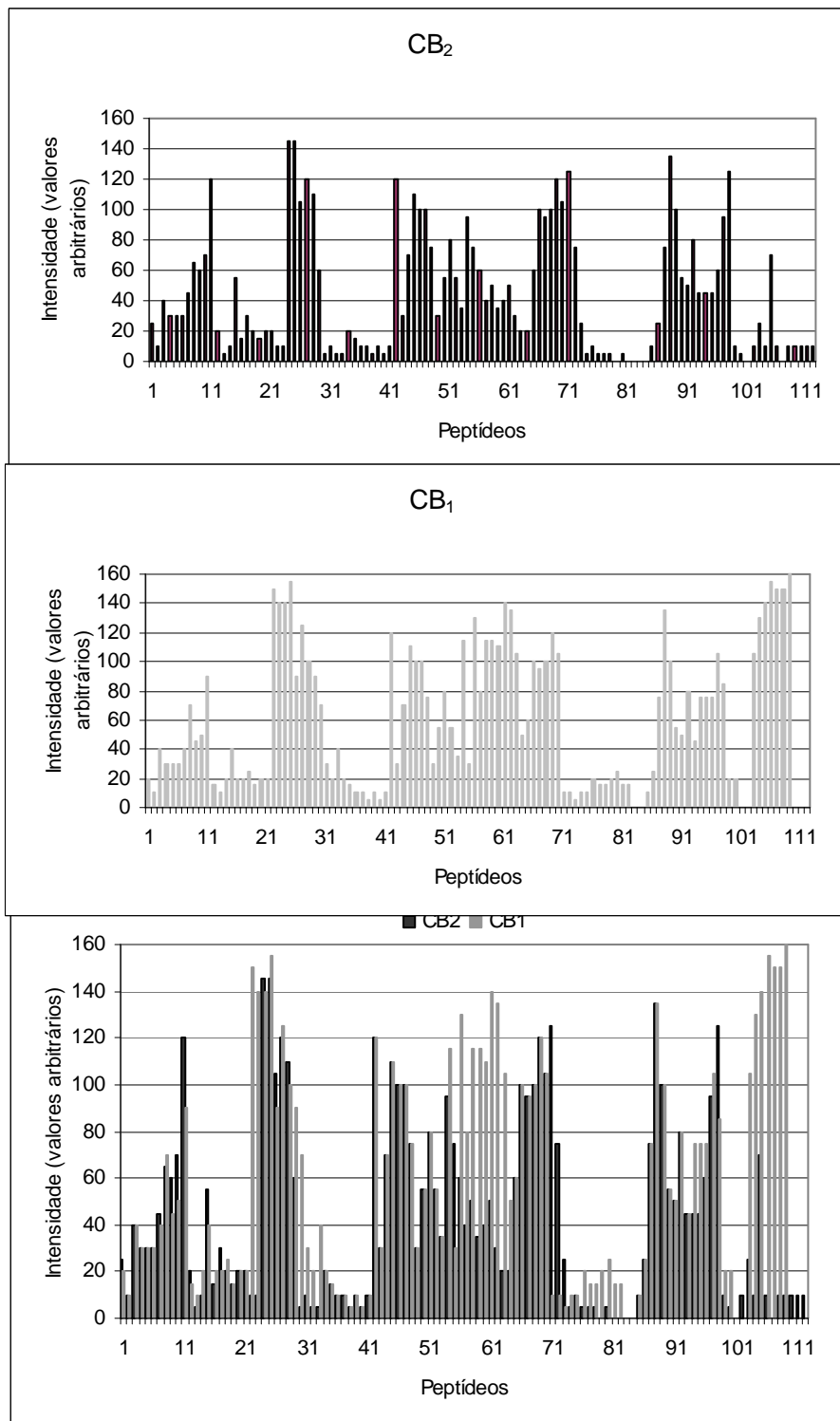


Figura 15 – Reatividade dos peptídeos sobrepostos das subunidades da crotoxina CB₁ e CB₂, após reação com 10 µg/ml de CA-FA e revelação com fosfatase alcalina e BCIP/MTT como substrato. Os histogramas foram elaborados após a membrana ser escaneada, os dados analisados com o software NIH Image e estão representados em valores arbitrários de intensidade.

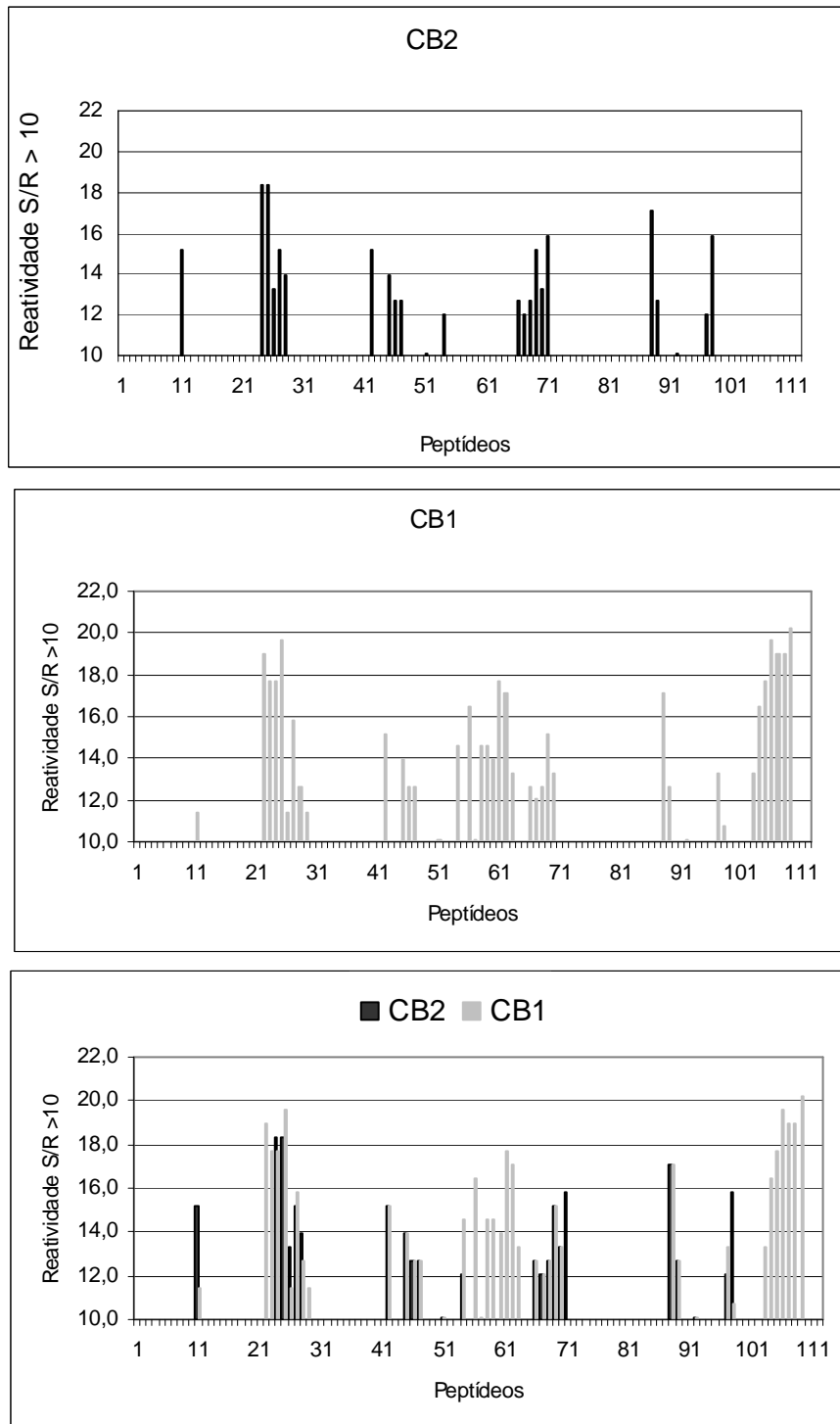


Figura 16 - Reatividade dos peptídeos sobrepostos das subunidades da crotoxina CB_1 e CB_2 , após reação com 10 $\mu\text{g/ml}$ de CA-FA e revelação com fosfatase alcalina e BCIP/MTT como substrato. Os histogramas foram elaborados após a membrana ser escaneada, os dados analisados com o software NIH Image e estão representados através da razão Sinal/Ruído (S/R).

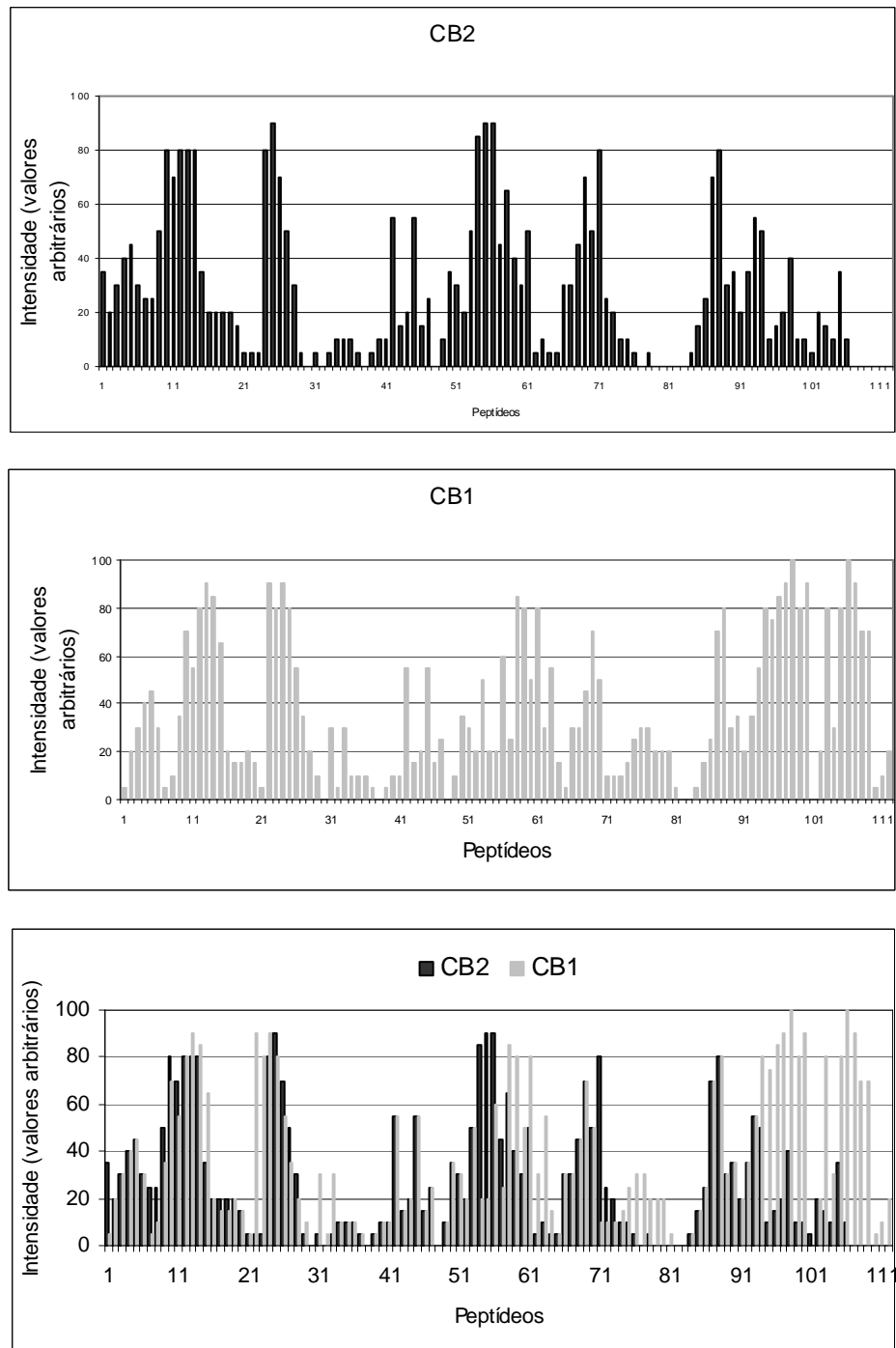


Figura 17 - Reatividade dos peptídeos sobrepostos das subunidades da crotoxina CB_1 e CB_2 , após reação com 10 $\mu\text{g/ml}$ de CNF-FA e revelação com fosfatase alcalina e BCIP/MTT como substrato. Os histogramas foram elaborados após a membrana ser escaneada, os dados analisados com o software NIH Image e estão representados em valores arbitrários de intensidade.

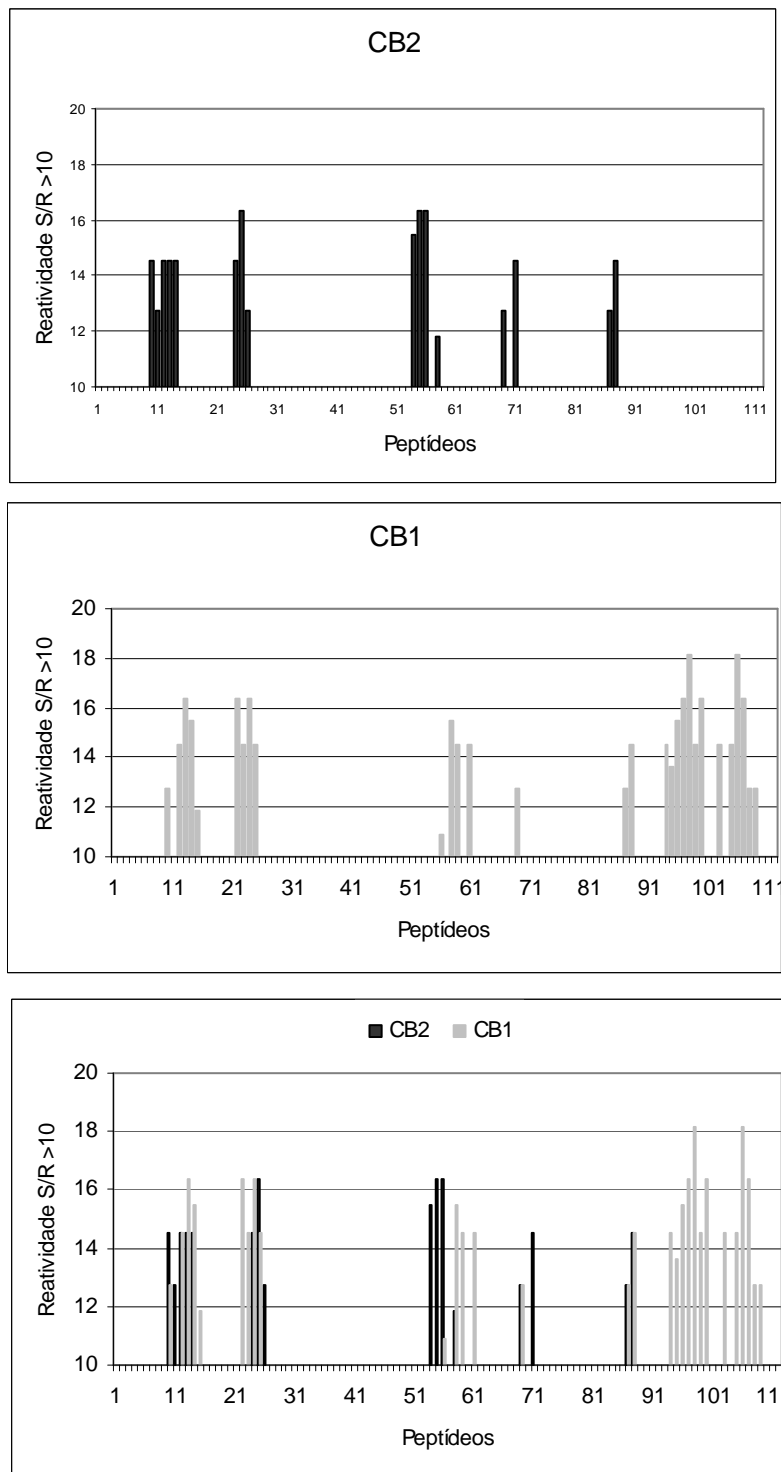
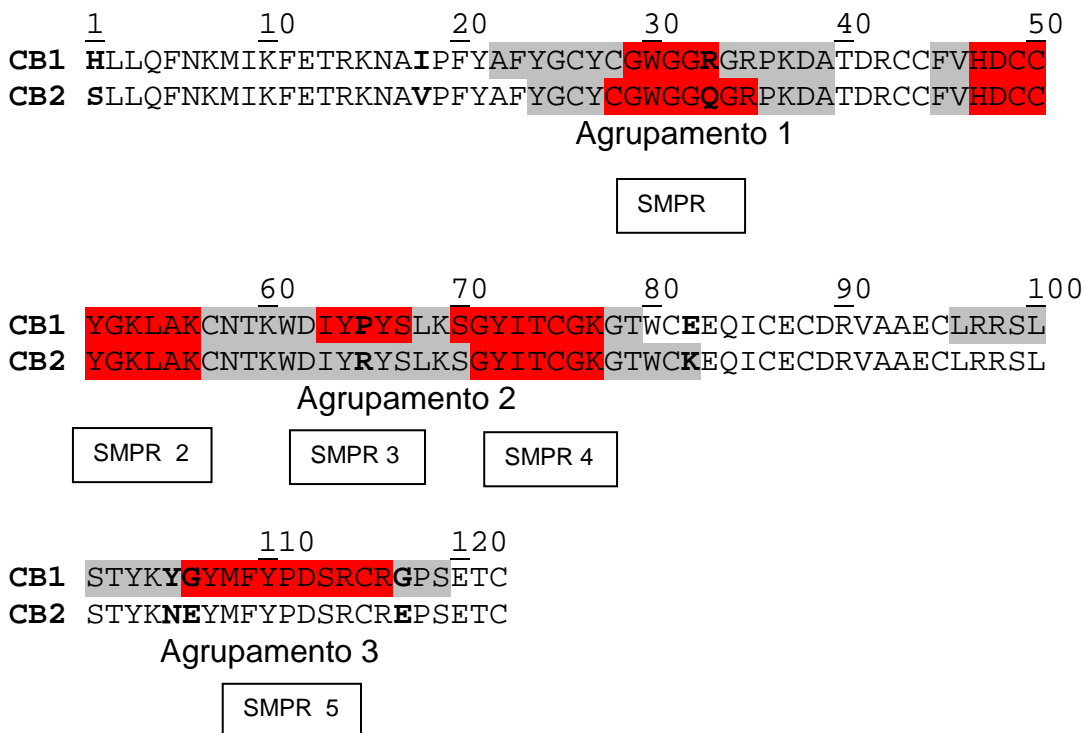


Figura 18 - Reatividade dos peptídeos sobrepostos das subunidades da crotoxina CB₁ e CB₂, após reação com 10 µg/ml de CNF-FA e revelação com fosfatase alcalina e BCIP/MTT como substrato. Os histogramas foram elaborados após a membrana ser escaneada, os dados analisados com o software NIH Image e estão representados através da razão Sinal/Ruído (S/R).

CA-FA



CNF-FA

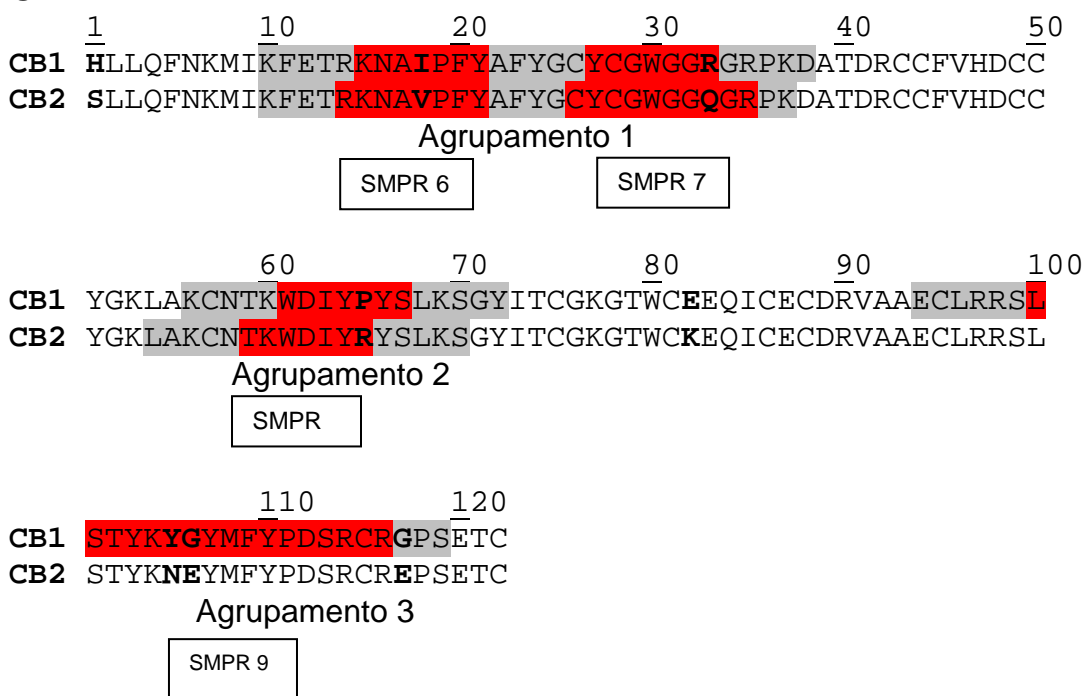


Figura 19 - Mapeamento dos segmentos lineares de peptídeos na sequência primária de CB₁ e CB₂ após reação com CA-FA ou CNF-FA. Os agrupamentos e as seqüências mínimas de peptídeos reativas (SMPR) estão coloridas de cinza e

vermelho, respectivamente. As substituições de resíduos de aminoácidos nas isoformas de CB estão em negrito.

5.5.3 Ensaio de competição

Foram feitos experimentos com CA-FA e CNF-FA usando concentração elevada de sal (500 mM de NaCl) nos tampões TBS, T-TBS e de saturação. Observou-se que não houve reatividade significativa; uma ligação pequena foi encontrada na região carboxiterminal de CB₁ tanto para CA quanto para CNF (dados não mostrados).

Para verificar se o competidor livre prejudicaria a ligação de CA-FA e CNF-FA à membrana, usou-se um excesso do competidor livre na presença do conjugado análogo. Tanto para CA-FA quanto para CNF-FA, não foi observada ligação significativa, o que confirma a reversibilidade da ligação (dados não mostrados).

Já nos experimentos com CA-FA em presença de um excesso de CNF, os agrupamentos de resíduos reativos 1 e 3 foram observados, mas apenas para CB₁ (fig. 20). No caso de CNF-FA na presença de excesso de CA o agrupamento 1 foi ligeiramente reativo, tanto para CB₁ quanto para CB₂. Já o agrupamento 3 apresentou reatividade mais significativa para CB₁, sendo possível identificar uma SMPR (R⁹⁷ – G¹¹⁸), semelhante à SMPR 9 (figura 19)

Os resultados obtidos aqui, entretanto, se referem a uma reatividade residual, uma vez que a reatividade observada foi muito menor que aquela apresentada nos experimentos com o conjugado sozinho (sem excesso do competidor), tanto que, para encontrar os agrupamentos de reatividade, usou-se S/R > 4, enquanto que para os demais ensaios descritos usou-se S/R > 10.

CA-FA + excesso de CNF

1 10 20 30 40 50
CB1 HLLQFNKMIKFETRKNAI**IPFYAFYGCYCGWGG**RGRPKDATDRCCFVHDC**C**
CB2 SLLQFNKMIKFETRKN**AVPFYAFYGCYCGWGG**QGRPKDATDRCCFVHDC**C**

60 70 80 90 100
CB1 YGKLAKCNTKWDI**YPYSLKSGYITCGKGTWC**EEQICECDRVAAE**CLRRSL**
CB2 YGKLAKCNTKWDI**RYSLKSGYITCGKGTWC**KEQICECDRVAAE**CLRRSL**

110 120
CB1 **STYKYGYMFYPDSRCR**GPSETC
CB2 STYK**NEYMFYPDSRCR**EPSETC

CNF-FA + excesso de CA

1 10 20 30 40 50
CB1 HLLQFNKMIKFETRKNAI**IPFYAFYGCYCGWGG**RGRPKDATDRCCFVHDC**C**
CB2 SLLQFNKMIKFETRKN**AVPFYAFYGCYCGWGG**QGRPKDATDRCCFVHDC**C**

60 70 80 90 100
CB1 YGKLAKCNTKWDI**YPYSLKSGYITCGKGTWC**EEQICECDRVAAE**CLRRSL**
CB2 YGKLAKCNTKWDI**RYSLKSGYITCGKGTWC**KEQICECDRVAAE**CLRRSL**

110 120
CB1 **STYKYGYMFYPDSRCR**GPSETC
CB2 STYK**NEYMFYPDSRCR**EPSETC

Figura 20- Mapeamento dos segmentos lineares de peptídeos na sequência primária de CB₁ e CB₂ após reação com CA-FA ou CNF-FA aos segmentos lineares de peptídeos de CB₁ e CB₂. Os agrupamentos e as seqüências mínimas de peptídeos reativas (SMPR) estão coloridas de cinza e vermelho respectivamente. As substituições de resíduos de aminoácidos nas isoformas de CB estão em negrito.

5.5.4 Identificação das prováveis seqüências de interação entre CA/CB e CNF/CB em um modelo de estrutura de CB₁ e CB₂

A partir da homologia de seqüência de CB com PLA₂, para as quais a estrutura tridimensional já foi esclarecida, foi obtida uma provável estrutura tridimensional de CB₁ e CB₂. As SMPR encontradas foram localizadas na estrutura terciária de CB₁ e CB₂ (Figuras 21 e 22). Na estrutura obtida, as regiões de reconhecimento tanto para CA quanto para CNF, encontram-se preferencialmente nas alças e voltas, ou seja, aparentemente acessíveis para interação com outras proteínas. É possível observar melhor as semelhanças e diferenças encontradas na interação entre as isoformas de CA e CNF com CB. Na porção N-terminal as regiões de interação entre as isoformas de CB e CNF são mais proeminentes que a mesma região de interação para CA. Entretanto, a região de interação central encontrada foi bem maior para CA do que CNF. Já a porção C-terminal, reativa apenas em CB₁ foi estruturalmente semelhante tanto para CA quanto para CNF.

CB1



CB₂



Figura 21 - Identificação das regiões reativas para CA na estrutura tridimensional de CB₁ e CB₂. Em vermelho, a SMPR N-terminal; em amarelo, as SMPR da região central; em verde a SMPR da região C-terminal.

CB₁



CB₂



Figura 22 - Identificação das regiões reativas para CNF na estrutura tridimensional de CB₁ e CB₂. Em vermelho, as SMPR N-terminal; em amarelo, a SMPR da região central; em verde a SMPR da região C-terminal.

6. Discussão

Uma etapa importante nos estudos bioquímicos sobre proteínas é a qualidade do produto com o qual se pretende trabalhar. Geralmente essa qualidade vem de um processo de purificação eficiente que alie alto grau de homogeneidade e atividade da proteína. CNF está presente, em pequena quantidade, no plasma de *C. d. terrificus*, representando menos de 0,1% do total de proteínas do mesmo. Neste trabalho foram usadas preparações de CNF obtidas por focalização isoelétrica e cromatografia de afinidade, onde se obteve a proteína fucional com alto grau de pureza (Fig. 4B).

CNF foi o primeiro membro de PLIs da classe γ a ser purificado, e foi caracterizado como um oligômero de subunidades do mesmo tipo na sua forma nativa (FORTES-DIAS et al., 1994). Mais tarde, quando o PLI- γ da serpente *Laticauda semifasciata* foi descrito como composto por dois tipos diferentes de subunidades polipeptídicas, a natureza homomérica de CNF foi questionada (OHKURA et al., 1999). À época, os autores concluíram que a banda de 20 KDa, apresentada em SDS-PAGE, numa preparação de CNF anteriormente relatada por Fotes-Dias et al. (1991), era, muito provavelmente, uma segunda subunidade de CNF. O fato de Perales et al., (1995) terem se referido a CICS como sendo uma glicoproteína oligomérica formada pela associação não covalente de duas subunidades diferentes, também contribuiu para este questionamento.

O perfil de SDS-PAGE obtido antes e após a deglicosilação de CNF (fig. 4), entretanto, não deixa dúvidas sobre a natureza homomérica de CNF. A inclusão de

CNF na sub-classe II de PLIs γ (tabela 2) proposta por Lizano et al. (2003) fica portanto confirmada.

Os agregados oligoméricos de CNF são formados por uma mistura de monômeros glicosilados e não glicosilados (fig. 4), e a proporção das duas formas varia entre as espécimens de *C. d. terrificus*. Ainda não se sabe quais fatores influenciariam em uma maior ou menor glicosilação do inibidor. Porém, a glicosilação não é fator relevante para a atividade inibidora de PLA₂ de CNF, como demonstrado neste estudo. O mesmo já havia sido esclarecido para os PLIs γ de *Laticauda semifasciata* (OHKURA et al. 1999) e de *Notechis ater* (HAINS et al., 2000). No entanto a não influencia dos carboidratos na atividade de inibidores de PLA₂ não é consenso. O PLI α de *Agkistrodon blomhoffii siniticus* recombinante expresso em bactéria, apresentou atividade biológica comparável à proteína nativa contra PLA₂ ácida, porém, não foi efetivo na inibição da atividade da PLA₂ básica homóloga. Essa ausência de atividade foi atribuída ao fato do inibidor, expresso em bactéria, não ser glicosilado (OKUMURA et al., 1999).

Experimentos utilizando a técnica de “binding” oferecem informações importantes quanto à ligação de proteínas à preparações de tecidos de diferentes espécies animais, bem como sobre o efeito de competidores pelo mesmo sítio ou sítios de ligação diferentes. As propriedades de ligação da crotoxina à membranas sinápticas foi previamente analisada em preparações de cobaio (TZENG et al., 1995a, DEGN et al., 1991) e peixe elétrico (DELÓT e BON, 1993; KRIŽAJ et al., 1996). O objetivo principal com os experimentos apresentados neste trabalho foi avaliar a influência de CNF sobre a ligação CA-¹²⁵ICB₂ a sinaptossomas cérebro corticais de rato.

Considerando estudos anteriores, de “binding” e “cross-linking”, os quais determinaram que somente CB permanece ligado ao sinaptossomas (KRIŽAJ et al., 1996; KRIŽAJ et al., 1997) e o fato de CNF ligar-se preferencialmente a CB₂ (FORTES-DIAS et al., 1994), a estratégia de trabalho adotada foi utilizar um complexo de crotoxina composto por apenas uma subunidade de CB (CB₂) e CA total, isto é, na forma como CA está naturalmente presente no veneno da serpente. No entanto, os resultados obtidos nos experimentos de competição da ligação de CA-¹²⁵ICB₂ por CA-CB₂, CA e CB₂ (fig. 8) estão de acordo com os descritos na literatura, para outros sistemas, alguns dos quais foram feitos com misturas de isoformas de CB. Apesar de o complexo crotoxina após a marcação não ter sido analisado quanto à sua atividade, estudos anteriores mostraram que a estrutura e função da crotoxina não são efetivamente afetadas pelo método de marcação utilizado neste trabalho (DEGN et al., 1991; TZENG et al., 1995a; KRIŽAJ et al., 1997). Os resultados de substituição de CA-¹²⁵ICB₂ pelo complexo não marcado, aliado aos perfis de competição homóloga e pelos componentes do complexo, semelhantes àqueles descritos por outros autores, nos quais se testou atividade do complexo marcado, fornecem evidências indiretas de que a atividade de CA-¹²⁵ICB₂ não foi comprometida pela marcação.

A presença de íons Ca²⁺ nos estudos de ligação de toxinas com atividade fosfolipásica tem sido uma questão de discussão na literatura. Os parâmetros cinéticos para a ligação de Ctx a sinaptossoma de cobaia praticamente não foram afetados pela presença de íons Ca²⁺ (DEGN et al., 1991). Já em um estudo no qual se utilizou membrana de *Torpedo marmorata*, concentrações entre 1 e 10 mM de CaCl₂ foram consideradas ideais para a ligação específica de Ctx (DÉLOT e BON, 1993). No entanto um aumento na ligação não específica da Ctx foi observado após

10 min. Este efeito, ausente quando os íons Ca^{2+} foram omitidos, foi atribuído à hidrólise da membrana devido à adição de uma grande quantidade de PLA_2 (crotoxina não marcada), a qual hidrolizaria a membrana criando novos sítios de ligação de baixa especificidade (DÉLOT e BON, 1993). Para sinaptossoma de cérebro de rato, usado neste estudo, a ligação não específica de $\text{CA-}^{125}\text{ICB}_2$ manteve-se estável até 100 min (fig 8) na presença de 1,8 mM de CaCl_2 , concentração usada em todos os ensaios de “binding”.

Em um estudo da inibição da ligação de Ctx a sinaptossomas de cobaio, vários competidores testados foram classificados como fortes, moderados, fracos, muito fracos ou não inibidores, baseado na sua força de inibição (DEGN et al., 1991). A crotoxina nativa ficou entre os competidores classificados como fortes, com IC_{50} em torno de 10 nM. Um valor próximo deste foi encontrado nos nossos experimentos em sinaptossoma de cérebro de rato ($\text{IC}_{50} = 16$ nM), indicando uma boa concordância dos resultados de ambas as preparações biológicas. Já CA parece ter sua potência influenciada pela membrana biológica. CA foi tão potente quanto Ctx nas membranas sinaptossomais de cobaio (DEGN et al., 1991), mas seu IC_{50} aumentou cerca de 10 vezes usando membrana de *Torpedo* (KRIŽAJ et al., 1997) e de cérebro de rato (presente trabalho). Portanto, baseado nos valores de IC_{50} (em torno de 100 nM), CA não poderia ser considerado, como um inibidor forte, mas sim, como um inibidor moderado para as duas últimas preparações biológicas citadas.

O efeito paradoxal dose dependente de CB encontrado em experimentos com sinaptossomas de cobaio (DEGN et al., 1991) e membranas de *Torpedo* (KRIŽAJ et al., 1996, 1997) foi confirmado para sinaptossoma de cérebro de rato (Fig. 9). No caso de membrana sináptica de *Torpedo marmorata* encontrou-se um perfil semelhante ao de CB quando se testou como competidores as β -neurotoxinas Agtx,

AtxC e AtnI₂, resultados que foram interpretados como indicadores de uma ausência de inibição (KRIŽAJ et al., 1996 e 1997). O efeito de CB₂ de aumentar a ligação de CA-¹²⁵ICB₂ em doses maiores que 10⁻⁶ M, pode ser explicado, provavelmente, pela tendência de CB₂ em formar agregados devido a seu caráter altamente básico (HABERMANN e BREITHAUP, 1978), a sua ligação a sítios não específicos na membrana (KRIŽAJ et al., 1996) ou ambos (tabela 5). Em uma ou outra situação, o resultado final seria uma diminuição na concentração de CB livre competindo pelo receptor na membrana e a indução de um aumento na ligação específica da Ctx marcada, como já sugerido anteriormente (KRIŽAJ et al., 1997).

Uma competição direta entre o receptor alvo e CNF por CA-¹²⁵ICB₂ foi avaliada com incubação simultânea de CNF, CA-¹²⁵ICB₂ e sinaptossoma (Tabela 6 B, Fig. 11). A comparação dos valores de IC₅₀ para CA-CB₂ e CNF indicam que, nas condições experimentais testadas, CA-CB₂ é cerca de 10 vezes mais potente que CNF como competidor (Tabela 6 A e B). Tal resultado seria esperado levando-se em conta o papel de chaperonina de CA na competição homóloga. Um ponto a ser considerado é o de que, quando CNF é o competidor, parte de ¹²⁵ICB₂ do complexo CA-¹²⁵ICB₂, é seqüestrado por CNF, formando um novo complexo estável CNF-¹²⁵ICB₂ (Tabela 6 B). A formação desse novo complexo com CNF substituindo CA na Ctx (FORTES-DIAS et al., 1994), foi mais evidente quando CNF foi pré-incubado com CA-¹²⁵ICB₂, antes da adição do sinaptossoma (tabela 6 D). Sob essa condição experimental, a razão inicial B/Bo foi reduzida para 60%, devido à formação do novo complexo CNF-¹²⁵ICB₂ na primeira etapa de incubação. Neste caso, a quantidade real de CA-¹²⁵ICB₂ disponível para ligação ao sinaptossoma no segundo período de incubação, foi portanto, consideravelmente reduzida (Tabela 6 D, interior da Fig. 11).

Valores comparáveis de IC₅₀ foram encontrados para CNF e CA como

competidores (100 e 97 nM, respectivamente). CA sozinho, obviamente, não apresenta o papel de chaperonina. CNF pode ser considerado então, como um competidor tão potente quanto CA para a ligação da Ctx a sinaptossomas de cérebro de rato (Fig. 9 e 11).

Apesar da Ctx não marcada ter sido tomada como referência para os experimentos com CNF, o modelo molecular de competição de ambos é completamente diferente. O modelo de referência (Ctx) envolve dois ligantes (Ctx marcada e não marcada) competindo pelo mesmo sítio receptor (R) na membrana, ou seja, são dois ligantes versus um receptor. Dois novos complexos serão formados, R-¹²⁵ICB₂ e R-CB₂. Quanto à CNF, ele não é capaz de competir pelo mesmo sítio receptor (R) mas, pelo ligante (CB), através de dois mecanismos diferentes. Primeiro, a formação do complexo estável CNF-¹²⁵ICB₂ (Tabela 6 B), que seqüestrando parte de ¹²⁵ICB₂, reduz a quantidade de ligante marcado disponível para ligação a sinaptossoma. Segundo, CNF age como um receptor alternativo para ¹²⁵ICB₂ já ligado ao sinaptossoma. Essas características fazem da competição por CNF um modelo único e complexo.

Na falta de um tratamento matemático mais adequado para descrever esta competição particular, a equação da lei de ação das massas, comumente empregada para análise de experimentos de ligação de radioligantes, foi empregada neste trabalho. A constante de dissociação no equilíbrio (K_d) de R-¹²⁵ICB₂ foi determinada como $1,2 \pm 0,3$ nM na presença de CA-CB₂ como competidor (Fig. 13, Tabela 5 A). Este valor é muito próximo daquele encontrado para Ctx e sinaptossoma de cobaio ($K_d = 2$ nM) (DEGN et al., 1991). Quando CA-CB₂ foi substituído por CNF, um K_d de $3,2 \pm 1,2$ nM foi obtido. Este aumento no valor de K_d não significa que CNF seja um melhor competidor que Ctx, porque os mecanismos

de competição para cada caso são diferentes, como já discutido. Este K_d reflete um aparente aumento na dissociação de R- $^{125}\text{ICB}_2$, devido à uma diminuição da concentração real de $^{125}\text{ICB}_2$ disponível para o receptor na membrana, associado à competição de CNF por $^{125}\text{ICB}_2$ ligado ao sinaptossoma.

Na condição de incubação na qual CNF foi adicionado após incubação prévia de CA- $^{125}\text{ICB}_2$ e sinaptossoma, observou-se um deslocamento apenas parcial, com máximo de 45%. Neste caso, CNF estaria competindo com $^{125}\text{ICB}_2$ já ligado a membrana. Apesar de ainda não estar completamente esclarecido o mecanismo pelo qual ocorre a ligação de CB ao receptor e a liberação de CA em solução (BON et al., 1979, DÉLOT e BON, 1993, KRIZAJ et al, 1996), a interação entre R-CB é provavelmente mais forte que entre CA-CB. Como descrito anteriormente, seriam dois receptores competindo pelo mesmo ligante. Apesar de os dados obtidos neste trabalho não permitirem conclusões quanto à afinidade de ligação, acredita-se que haja um provável equilíbrio de ligação do ligante (CB) aos dois receptores, o de membrana e CNF.

Quanto às atividades farmacológicas de CNF, estudos anteriores já haviam demonstrado sua capacidade inibitória da atividade fosfolipásica *in vitro* e sua proteção contra a neurotoxicidade do veneno crotálico e Ctx *in vivo* (FORTES-DIAS et al., 1991, 1994, 1999; PERALES et al.,1995). Faure et al. (2000), utilizando sinaptossomas de *Torpedo marmorata*, mostraram que CICS (mesma proteína que CNF) inibe a liberação de acetilcolina induzida por β -neurotoxinas de serpentes da família *Viperidae* como crotoxina, Mojave toxina e CbICbII (β -neurotoxina do veneno de *Pseudocerastes field*). Quando as β -neurotoxinas testadas foram pré-incubadas por 1h com quantidades crescentes de CICS, e comparada com o controle (sem CICS), foi observada uma inibição dose dependente da liberação primária de Ach.

Um ponto importante no presente trabalho são os resultados obtidos nas diferentes condições testadas. Os experimentos de inibição das atividades fosfolipásica e neurotóxica dos vários inibidores descritos, são, em sua grande maioria, realizados com pré-incubação da toxina com o inibidor. Aqui, demonstrou-se que CNF é capaz, não só de inibir a ligação de CB ao sinaptossoma quando ambos são colocados em contato com o tecido ao mesmo tempo, como também de deslocar CB já ligado ao tecido. Ainda que a inibição neste último caso não tenha atingido 50%, nas condições testadas, este dado torna-se relevante quando se projeta uma provável utilização de CNF no tratamento de envenenamento crotálico. Neste caso, onde a toxina já está na circulação da vítima, seria desejável que um antídoto agisse não somente ligando-se à toxina circulante, neutralizando-a, como também deslocasse a porção já ligada. Deve-se considerar que CNF inibe não apenas PLA₂ da cascavel sulamericana, mas também PLA₂ neurotóxicas do veneno de outras serpentes da família Viperidae (Fortes-Dias et al., 1990; 2000, Faure et al., 2000), e que não inibe PLA₂ secretória humana (Faure et al., 2000). Assim sendo, CNF poderia ser usado como um antídoto não apenas para envenenamento crotálico, mas também como auxiliar no tratamento de envenenamentos por outras serpentes, provavelmente não interferindo na ação de fosfolipases humanas.

Os resultados obtidos permitiram o aperfeiçoamento do modelo esquemático, anteriormente proposto, da interação da crotoxina com o seu receptor alvo e CNF (FORTES-DIAS et al., 1994). Neste modelo foi incluída uma etapa adicional de equilíbrio entre CNF-CB e R-CB (receptor-CB), representando a competição entre R e CNF por CB (Fig. 23).

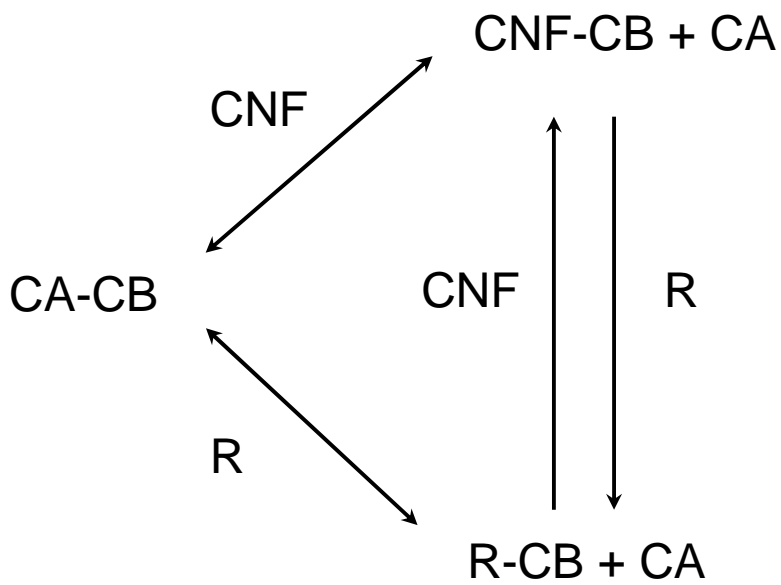


Figura 23 – Representação esquemática das interações entre CA-CB, o seu receptor na membrana pré-sináptica (R) e CNF. O modelo foi atualizado em relação ao anterior (FORTES-DIAS et al., 1994) com a introdução do equilíbrio entre CNF-CB e R-CB na presença de R e CNF, respectivamente.

Os efeitos das fosfolipases de venenos são dependentes das respostas mediadas pela interação entre a toxina e seus receptores, mas outros mecanismos de interação PLA₂/membrana, como a estrutura da molécula, podem também contribuir para a toxicidade destas proteínas (CHIOATO e WARD, 2003). A crotoxina é um exemplo clássico da importância da estrutura quaternária na toxicidade do heterodímero, em comparação com cada subunidade individualmente (HABERMANN e BREITHAUPT, 1978; FAURE et al., 1993).

Cada espécimen de *C. d. terrificus* sintetiza cinco a dez isoformas diferentes de Ctx, formadas pela combinação 1:1 das isoformas de CA e CB, presentes em proporções variáveis (FAURE e BON, 1987). Em um estudo com diferentes complexos de Ctx formados, aleatoriamente, com duas isoformas de CA e quatro de CB, demonstrou-se que as isoformas de CA são funcionalmente idênticas no complexo. No entanto, dependendo da isoforma de CB presente, duas classes de complexos de crotoxina foram identificadas, uma enzimaticamente menos ativa e farmacologicamente mais potente que a outra (FAURE e BON 1988). Uma vez que as diferenças na função não foram observadas para as isoformas de CB isoladas, foi sugerido que as alterações de função dos complexos, fossem devidas às diferenças nas interações entre suas subunidades (FAURE e BON, 1988). Mais tarde foi proposto que as substituições de resíduos nas isoformas de CB poderiam ser responsáveis pelas diferenças nas interações entre as subunidades CA/CB (FAURE et al., 1994), e conseqüentemente na sua atividade. No presente estudo, o qual teve como um dos seus objetivos, analisar as interações entre CB/CA e CB/CNF, observou-se que nas possíveis regiões de interação identificadas estão seis das oito substituições de aminoácidos das isoformas de CB testadas (CB₁ e CB₂).

As PLA₂ neurotóxicas pré-sinápticas apresentam uma extensa superfície biologicamente ativa, que vai da região do “loop” C-terminal, passando pelo “loop” de ligação ao Ca²⁺, e inclui posições na hélice terminal e folha-β (CHIOATO e WARD, 2003). O estudo com síntese múltipla de peptídeos (“spot”) revelou 3 regiões de reconhecimento em CB₁ e CB₂ tanto para CA quanto para CNF: uma na porção N-terminal (nas proximidades dos aminoácidos 20 a 40 para CA e 10 a 40 para CNF), na região central (em torno do resíduo 60) e outra na porção C-terminal, neste último caso somente para a isoforma CB₁ (Figura 19).

As regiões N e C-terminal parecem ter um papel importante nas atividades enzimáticas e farmacológicas características de CB. A clivagem de CB por CNBr, resultou em 3 fragmentos, contendo as regiões N-terminal, central e C-terminal. Tal tratamento reduziu drasticamente a atividade enzimática, miotóxica e afetou parcialmente a letalidade dentre outras funções (SOARES et al., 2001). Além disso a região N-terminal tem sido considerada de importância para a neurotoxicidade de N6-PLA₂ (PLA₂ de venenos de serpentes com atividade miotóxica e neurotóxia e N na posição 6) (CHEN et al., 2004).

Tzeng et al, (1995b) fizeram mutação sítio dirigida na PLA₂ pancreática bovina, alterando F²¹ por Y²¹. Essa modificação tornou a PLA₂ bovina capaz de reduzir significativamente a especificidade de ligação da crotoxina à vesículas sinaptossomais de cobaio. Considerando o fato de que PLA₂'s neurotóxicas têm Y na posição correspondente a F da enzima bovina, e que as fosfolipases que possuem F²¹ apresentam pouca ou nenhuma toxicidade, Y²¹ foi considerado um determinante importante para a neurotoxicidade (TZENG et al, 1995b). No presente estudo, Y²¹ está ao lado do agrupamento 1 para CA-FA e incluído em SMPR 6, referente à interação de CNF-FA com os peptídeos imobilizados em membrana.

Inoue et al. (1997) em um estudo com o PLI γ de *Naja kaouthia* (um inibidor de amplo espectro de ação) sugeriram que este possa ligar-se às PLA₂ via um elemento estrutural restrito comum, conservado dentre todos os grupos de PLA₂. Foi considerado que o sítio de ligação do inibidor envolvesse o “loop” de ligação ao Ca²⁺ das PLA₂, o qual é conservado dentre todas as PLA₂ secretórias, inclusive na Ctx. No caso da Ctx, os resíduos propostos como constituintes do “loop” nesta ligação são Y²⁷, G²⁹, G³¹, D⁴⁸ (RADVANYI et al., 1989). Esses aminoácidos estão compreendidos nos agrupamentos de aminoácidos reativos de CB₁ e CB₂, tanto para CA quanto para CNF (exceto D⁴⁸ para CNF). No caso de CNF, este apresentou um agrupamento de aminoácidos reativos maior do que o de CA, com duas SMPR.

Quando a membrana foi testada com CA-FA, encontrou-se um amplo agrupamento de aminoácidos reativos na região central (resíduos 45 a 80). Foi proposto por Tsai et al., (1987) que os resíduos 59, 65, 70, 72, 73 e 98 das enzimas de serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae, estariam relacionados com a neurotoxicidade. Segundo o autor, no contexto da estrutura terciária das PLA₂, os resíduos 59-65, 70-73 e 97 ou 98 estão agrupados do lado de fora e próximos ao sítio catalítico. Nas estruturas diméricas ou triméricas de toxinas, as subunidades auxiliares, como é CA na Ctx, geralmente estabilizam ou protegem a subunidade tóxica. Essa ação evita a sua ligação não específica a vários tecidos, ou ainda, ajuda a subunidade tóxica a interagir especificamente com seus sítios de reconhecimento na membrana pré-sináptica (CHEN et al., 2004). Considerando a ação de CA de potencializar a neurotoxicidade de CB e os resíduos de aminoácidos envolvidos nesta ação, os resultados mostrando a região reativa na porção central de CB, quando a membrana foi analisada com CA (Fig. 19), são coerentes com a ação de chaperonina desta última. CNF, no entanto, apresentou uma região de reatividade

central menor do que a de CA, mas que também abrange os aminoácidos envolvidos na neurotoxicidade. Possivelmente essa interação está relacionada ao fato de CNF ser capaz de inibir a toxicidade da Ctx.

A amoditoxina é uma PLA₂ neurotóxica pré-sináptica de cadeia única, presente no veneno de *Vipera ammodytes ammodytes*, e apresenta uma similaridade imunológica na seqüência de aminoácidos com CB. Em um estudo com amoditoxina, demonstrou-se que a porção C-terminal de CB está envolvida na ação farmacológica da crotoxina (CURIN-SERBEC et al., 1994). Anticorpos contra amoditoxina, foram capazes de reconhecer CB isolado, já a crotoxina foi fracamente reconhecida por todos os anticorpos contra peptídeos de amoditoxina. Sugeriu-se que a porção C-terminal de CB é mascarada ou sofre uma mudança conformacional no complexo crotoxina. Demonstrou-se também, que anticorpos policlonais preparados contra CB reagiram mais fortemente com a sua porção C-terminal do que a N-terminal e central. Uma estrutura molecular gerada por computação mostrou que as cadeias laterais no peptídeo N-terminal estão muito menos expostas do que o peptídeo C-terminal. A região C-terminal é uma região sabidamente relevante na atividade não apenas da crotoxina. Essa região exerce papel importante em diferentes ações como miotoxicidade e citotoxicidade, rompimento de lipossomas para os venenos de serpentes da família *Crotalinae*, nas atividades biológicas de miotoxina II de *Bothrops asper* e atividades de miotoxicidade e danos em membranas de miotoxinas K49-PLA₂ (SOARES et al., 2001; LOMONTE 1994, CHIOATO e WARD, 2003).

Alguns modelos de estrutura tridimensional de CB foram propostos (CHOUMET et al., 1992; CURIN-SERBEC, et al., 1994). As regiões 53-70 e 85-91 e 90-108 têm sido propostas como partes envolvidas na toxicidade e interação entre

CB e CA, baseado em métodos de mapeamento com anticorpos monoclonais (CHOUMET et al., 1999). A região de peptídeos 53-70, compreendida na região de interação de CB com CA está localizada na região central (Figuras 19 e 21), tanto para CB₁ quanto para CB₂. A região 93-108 é semelhante à provável seqüência linear de interação encontrada na porção C-terminal para CA/CB, mas apenas para CB₁. A principal diferença de reatividade entre as isoformas CB₁ e CB₂ tanto para CA quanto para CNF foi na região C-terminal, onde se encontram 3 substituições Y¹⁰⁵/N¹⁰⁵, G¹⁰⁶/E¹⁰⁶ e G¹¹⁷/E¹¹⁷ em CB₁/CB₂. CA e CNF, são ambas, proteínas ácidas, o que justifica uma interação com a região C-terminal de CB₁ que é menos negativamente carregada que CB₂.

CNF é um PLI γ capaz de inibir não apenas sua PLA₂ homóloga, mas também PLA₂ de diferentes espécies de serpentes Viperidae (FORTES-DIAS et al, 1999; FAURE et al 2000). As β -neurotoxinas de serpentes da família Viperidae (PLA₂ do grupo II) associam-se fortemente a CICS (CNF) (FAURE et al 2000). Já as β -neurotoxinas monoméricas de Viperidae, Atx e Agtx ligam-se menos efetivamente a CICS do que as subunidades PLA₂ isoladas de β -neurotoxinas multiméricas de Viperidae. O mesmo comportamento foi observado no caso de CbICbII, no qual apenas a subunidade básica CbII e a toxina total associaram-se a CICS. As subunidades de PLA₂ (CB, CB Monjave e CbII) quando isoladas dos seus complexos ligaram-se a CICS mais rapidamente do que no complexo (valor de k_{on} foi 10 vezes maior). Somente um excesso molar de 2 vezes de CICS foi suficiente para a inibição quase total da atividade fosfolipásica das subunidades de PLA₂, enquanto um excesso de 8 vezes foi necessário para o mesmo grau de inibição no caso da toxina total (FAURE et al 2000). Portanto, estes dados sugerem que CA e CNF competem por sítios de ligação semelhante a CB como aqui demonstrado (Fig. 22 e 23).

Nos experimentos nos quais foi usada uma elevada concentração de sal, o resultado encontrado de ausência de reatividade era esperado, uma vez que as subunidades do complexo Ctx estão ligadas por forças eletrostáticas (RUBSAMEN et al., 1971; BREITHAUPT 1976a). Apesar do complexo CB/CNF, ser estável e dissociável apenas em condições desnaturante, acredita-se essa interação que não envolva ligações covalentes (FORTES-DIAS et al., 1994). Essa hipótese foi reforçada pela ausência de ligação, aos peptídeos da membrana, quando se incubou CNF em presença de elevada concentração de sal. A ligação de CA-FA e CNF-FA à membrana é reversível, como demonstrado nos experimentos de competição do ligante conjugado por excesso do mesmo nativo.

Diferentes ferramentas como predição computacional, mapeamento de superfície, modificações químicas, mutação sítio dirigida, dentre outras, têm sido úteis para o entendimento da interação entre as PLA₂ e outras proteínas (SOARES et al., 2001; CHIOATO e WARD, 2003; CECCHINI et al., 2004) . No presente estudo, utilizou-se o método de síntese múltipla de peptídeos para analisar a interação entre CA/CB e CB/CNF.

Em 2004, Checchini et al., demonstraram que CA foi capaz de inibir atividades farmacológicas como indução de edema, aumento nos níveis de creatina quinase, e danos a membranas causados por PLA₂ de venenos de *Bothrops*. A partir desses dados, levantou-se a hipótese do uso de crotapotina para fins terapêuticos nos casos de envenenamento por *Bothrops* e outros venenos contendo PLA₂, (CECCHINI et al., 2004). O uso de CA foi considerado, pelos autores, como uma ferramenta promissora para explorar a estrutura das PLA₂ e sua relação com a atividade biológica. Da mesma forma, um melhor entendimento CNF, e sua interação com PLA₂ tóxicas será útil na investigação do mecanismo de ação e

intoxicação por Ctx e outras PLA₂ tóxicas, bem como no desenvolvimento de terapêuticas futuras para o envenenamento por acidentes ofídicos. Embora se tenha trabalhado com estrutura linear, os resultados aqui obtidos fornecem informações a respeito da interação entre CA/CB e CB/CNF, úteis em estudos posteriores da estrutura das moléculas.

7. Conclusões

- A purificação de CNF por focalização isoelétrica seguida de cromatografia de afinidade, permitiu a obtenção de uma proteína com alto grau de pureza, com manutenção da atividade biológica.
- CNF está presente no plasma da *C. d. terrificus*, como uma mistura das formas glicosilada e não glicosilada.
- A presença de carboidratos não é essencial para a atividade inibidora de fosfolipase A2 de CNF.
- CNF é capaz de inibir a ligação de Ctx à sinaptossomas cérebro cortical de ratos, de forma dose dependente, nas diferentes condições testadas.
- CNF é capaz de deslocar, ainda que parcialmente, a ligação de Ctx à sinaptossomas cérebro cortical de ratos.
- Os possíveis segmentos lineares de interação entre CA-CB e CNF-CB foram determinadas.
- Houve coincidência em algumas regiões de reconhecimento para CA e CNF.
- Das 8 substituições de aminoácidos nas isoformas testadas, 6 estão envolvidas nas regiões de reconhecimento.

8. Referências

AIRD, S. D., Yates, J. R. 3rd, Martino, P. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F, Kaiser I. I. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. *Biochim Biophys Acta*, v. 3; n. 1040(2), p. 217-24, set. 1990.

AIRD, S. D, Kaiser, I. I., Lewis, R.V., Kruggel, W.G. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. *Arch. Biochem. Biophys.*; v. 249, n. 2, p. 296-300, set. 1986.

AIRD, S. D., Kaiser, I. I., Lewis, R. V., Kruggel, W. G. Rattlesnake presynaptic neurotoxins: primary structure and evolutionary origin of the acidic subunit. *Biochemistry*, v. 3, n. 24(25), p. 7054-8, dez. 1985.

BON, C. The natural toxins. *Biochimie* v. 82, p. 791-792, 2000.

BON, C., Jeng, T. W. Crotoxin: a possible mechanism of action. *Adv. Cytopharmacol.* v. 3, p. 231-235, 1979.

BON, C., Changeux, J. P., Jeng, T. W., Fraenkel-Conrat, H. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *Eur. J. Biochem.*, v. 99, n. 3, p. 471-481, set. 1979.

BRASIL, Ministério da Saúde, FNS. *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*. Brasília, 131p., 1999.

BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A₂ and the crotoxin complex. *Toxicon*, v. 14, n.3, p. 221-233, 1976a.

BREITHAUPT, H. Neurotoxic and myotoxic effects of crotalus phospholipase A and its complex with crotapotin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* v. 292, n. 3, p. 271-278, mar. 1976b.

BREITHAUPT, H., Rübsamen, K., Habermann, H. Biochemistry and pharmacology of crotoxin complex. *Eur. J. Biochem*, v.49, p. 333-335. jun. 1974.

CAMPBELL, J. A and Lamar, W. W.. *The venomous reptiles of latin América*, New York: Cornell University Press, 1989, p. 330, 340, 345, 425.

CARDOSO, J. L. C., França, F. O. S., Fan H. W., Málaque, C. M. S., Haddad Júnior, V. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier - FAPESP, 2003. p. 33-61, 91-98, 468.

CECCHINI, A. L., Soares, A. M., Cecchini, R., de Oliveira, A.H., Ward, R.J., Giglio, J.R., Arantes, E.C. Effect of crotapotin on the biological activity of Asp49 and Lys49 phospholipases A(2) from Bothrops snake venoms. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*, v. 138, n. 4, p. 429-436, ago. 2004.

CHEN, Y-H, Wang, Y-M., Hseu, M-J., Tsai, I-H. Molecular evolution and structure-function relationships of crotoxin-like and Asn 6-containing phospholipase A₂ in pit viper venoms. *Biochem. J.* v.381 p. 25-34, jul. 2004.

CHIOATO, L., Ward, R. J., Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. *Toxicon*, v. 42, n. 8, p. 869-883, dez. 2003.

CHIPPAUX, J.-P. and Goyffon, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*, v. 36, n. 6, p. 823-846, 1998.

CHOUMET. V., Lafaye, P., Demangel, C., Bon, C., Mazie, J. C. Molecular mimicry between a monoclonal antibody and one subunit of crotoxin, a heterodimeric phospholipase A₂ neurotoxin. *Biol. Chem.* v. 380, n. 5, p. 561-568, mai. 1999.

CHOUMET, V., Faure, G., Robbe-Vincent, A., Saliou, B., Mazie, J. C., Bon, C. Immunochemical analysis of a snake venom phospholipase A₂ neurotoxin, crotoxin, with monoclonal antibodies. *Mol Immunol.*, v. 29, n. 7-8, p.871-882, jul-ago. 1992.

CUPO, P., Marques, M. M., Hering, S. E. Crotalid bites in children: clinical, laboratory, epidemiologic aspects and treatment approach. *Rev Soc Bras Med Trop.* v. 24, n. 2, p. 87-96, abr.- jun. 1991.

CURIN-SERBEC. V., Delot, E., Faure, G., Saliou, B., Gubensek, F., Bon, C., Choumet, V. Antipeptide antibodies directed to the C-terminal part of ammodytoxin A

react with the PLA₂ subunit of crotoxin and neutralize its pharmacological activity.

Toxicon. v. 32, n. 11, p. 1337-1348, nov. 1994.

DAVIDSON, F. F., Dennis, E. A. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. *J. Mol Evol*. v.31, p. 228-238, 1990.

DEGN, L. L., Seebart, C. S., Kaiser, I. I. Specific binding of crotoxin to brain synaptosomes and synaptosomal membranes. *Toxicon*. v. 29, n. 8, p. 973-988, 1991.

DELOT, E., Bon, C . Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin, with presynaptic membranes. *Biochemistry*. v. 32, n. 40, p. 10708-10713, out. 1993.

DOMONT, G. B., Perales, J., Moussatche, H. Natural anti-snake venom proteins. *Toxicon*. v. 29, n. 10, p. 1183-1194, 1991.

DUNKLEY, P. R., Heath, J. W., Harrison, S.M., Jarvie, P. E., Glenfield, P. J., Rostas, J. A. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res*. v. 441, n. 1-2, p. 59-71, fev. 1988.

FAURE, G., Copic, A., Le Porrier, S., Gubensek, F., Bon, C., Krizaj, I. Crotoxin acceptor protein isolated from *Torpedo* electric organ: binding properties to crotoxin by surface plasmon resonance. *Toxicon*. v. 41, n. 4, p. 509-517, mar. 2003.

FAURE, G. Natural inhibitors of toxic phospholipases A(2). *Biochimie*. v. 82, n. 9-10, p. 833-840, set. - out. 2000.

FAURE, G., Villela, C., Perales, J., Bom, C. Interaction of the neurotoxic and nontoxic secretory phospholipases A2 with the crotoxin inhibitor from *Crotalus* serum. *Eur. J. Biochem*. v. 267, n. 15, p. 4799-4808, ago. 2000.

FAURE, G., Choumet, V., Bouchier, C., Camoin, L., Guillaume, J. L., Monegier, B., Vuilhorgne, M., Bon, C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur. J. Biochem*. v. 223, n. 1, p. 161-164, jul. 1994.

FAURE, G., Harvey, A. L., Thomson, E., Saliou, B., Radvanyi, F., Bon, C. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. *Eur J Biochem*. v. 214, n. 2, p. 491-496, jun. 1993.

FAURE, G., Bom, C. Crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. *Biochemistry*. v. 27, n. 2, p. 730-738, jan. 1988.

FAURE, G., Bom, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*. v. 25, n. 2, p. 229-234, 1987.

FORTES-DIAS, C. L., Barcellos, C. J., Estevão-Costa, M. I. Molecular cloning of a γ -phospholipase A₂ inhibitor from *Lachesis muta muta* (the bushmaster snake). *Toxicon*, v. 41, p. 909-917, 2003.

FORTES-DIAS, C. L. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipases A₍₂₎ in the blood plasma of snakes. *Toxicon*. v. 40, n. 5, p. 481-484, mai. 2002.

FORTES-DIAS, C. L., Jannotti, M. L., Franco, F. J., Magalhaes, A., Diniz, C. R. Studies on the specificity of CNF, a phospholipase A₂ inhibitor isolated from the blood plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). I. Interaction with PLA₂ from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon*. v. 37, n. 12, p. 1747-59, dez. 1999.

FORTES-DIAS, C. L., Lin, Y., Ewell, J., Diniz, C. R., Liu, T. Y. A phospholipase A₂ inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Protein structure, genomic structure, and mechanism of action. *J. Biol. Chem.* v. 269, n. 22, p. 15646-15651, jun. 1994.

FORTES-DIAS, C. L., Fonseca, B. C., Kochva, E., Diniz, C. R. Purification and properties of an antivenom factor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon*. v. 29, n. 8, p. 997-1008, 1991.

FORTES-DIAS, C. L., Diniz, C. R., Kochva, E., Neutralization by homologous plasma of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and crotoxin. *Ciência e Cultura*. v. 42, n. 7, p. 501-506, 1990.

GLASER, K. B., Mobilio, D., Chang, J. Y., Senko, N. Phospholipase A₂ enzymes: regulation and inhibition. *Trends Pharmacol. Sci.* v. 14, n. 3, p. 92-98, mar. 1993.

HABERMANN, E., Breithaupt, H. The crotoxin complex--an example of biochemical and pharmacological protein complementation. *Toxicon.* v. 16, n. 1, p. 19-30, 1978.

HABERMANN, E., Hardt, K. L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Anal. Biochem.* v. 50, p.163, 1972.

HAINS, P. G., Broady, K. W. Purification and inhibitory profile of phospholipase A₂ inhibitors from Australian elapid sera. *Biochem. J.* v. 346, n. 1, 139146, fev. 2000.

HAINS, P. G., Sung, K. L., Tseng, A., Broady, K. W. Functional characteristics of a phospholipase A(2) inhibitor from *Notechis ater serum*. *J. Biol. Chem.* v. 275, n. 2, p. 983-991, jan. 2000.

HARRIS, J. B. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. *Pharmac. Ther.* v. 31, p. 79-102, 1985. *apud* Kini, R. M., Evans, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon.* v. 27, n. 6, p. 613-635.

HARLOW, E., Lane, D. Antibodies: a laboratory manual. USA, 3^a ed. 1988, p. 349.

HENDON, R. A., Tu, A. T. The role of crotoxin subunits in tropical rattlesnake neurotoxic action. *Biochim Biophys Acta.* v. 578, n. 1, p. 243-252, mai. 1979.

HENDON, R. A., Fraenkel-Conrat, H. Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 67, n. 7, p. 1560-1563, jul. 1971.

HSEU, M. J., Yen, C. H., Tzeng, M. C. Crocalbin: a new calcium-binding protein that is also a binding protein for crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂. *FEBS Lett.* v. 445, n. 2-3, p. 440-444, fev. 1999.

HSEU, M. J., Yen, C. Y., Tseng, C. C., Tzeng, M. C. Purification and partial amino acid sequence of a novel protein of the reticulocalbin family. *Biochem Biophys Res Commun.* v. 239, n. 1, p. 18-22, out. 1997.

INOUE, S., Shimada, A., Ohkura, N., Ikeda, K., Samejima, Y., Omori-Satoh, T., Hayashi, K. Specificity of two types of phospholipase A₂ inhibitors from the plasma of venomous snakes. *Biochem Mol Biol Int.* v. 41, n. 3, p. 529-537, mar. 1997.

INOUE, S., Kogaki, H., Ikeda, K., Samejima, Y., Omori-Satoh, T. Amino acid sequences of the two subunits of a phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biol. Chem.* v. 266, p. 1001-1007, 1991.

JENG, T. W., Hendon, R. A., Fraenkel-Conrat, H. Search for relationships among the hemolytic, phospholipolytic, and neurotoxic activities of snake venoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 75, n. 2, p. 600-604, fev. 1978.

KATTAH, L. R., Ferraz, V., Matos Santoro, M., Ribeiro da Silva Camargos, E, Ribeiro Diniz C., De Lima, M. E. Analysis of fatty acids released by crotoxin in rat brain synaptosomes. *Toxicon*. v. 40, n. 1, p. 43-49, jan. 2002.

KINI, R. M., Evans, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon*. v. 27, n. 6, p. 613-635, 1989.

KOGAKI, H., Inoue, S., Ikeda, K., Samejima, Y., Omori-Satoh, T., Hamagushi, K. Isolation and fundamental properties of a phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biochem.* v. 106, p. 966-971, 1989.

KRIŽAJ, I., Gubensek, F. Neuronal receptors for phospholipases A₍₂₎ and beta-neurotoxicity. *Biochimie*. v. 82, n. 9-10, p. 807-914, set.-out. 2000.

KRIŽAJ, I., Faure, G., Gubensek, F., Bom, C. Neurotoxic phospholipases A₂ ammodytoxin and crotoxin bind to distinct high-affinity protein acceptors in *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochemistry*. v. 36, n. 10, p. 2779-2787, mar. 1997

KRIŽAJ, I., Faure, G., Gubensek, F., Bom, C.. Re-examination of crotoxin-membrane interactions. *Toxicon*. v. 34, n. 9, p. 1003-1009, set. 1996.

LAMBEAU, G., Lazdunski, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. *Trends Pharmacol Sci*. v. 20, n. 4, p. 162-170, abr. 1999.

LENNON, B. W., Plummer, D., Kaiser, I. I. Effects of subunit cross-linking on the properties of crotoxin. *Toxicon*. v. 28, n. 6, p. 718-722, 1990.

LIZANO, S., Domont, G., Perales, J. Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon*. v. 42, n. 8, p. 963-77, dez. 2003.

LIZANO, S., Ângulo, Y., Lomonte, B., Fox, J. W., Lambeau, G., Lazdunski, M., Gutierrez, J. M. Two phospholipase A₂ inhibitors from the plasma of *Cerrophidion* (Bothrops) *godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A₂ myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. *Biochem. J.* v. 346, n. 3, p. 631-639, mar. 2000.

LIZANO, S., Lomonte, B., Fox, J. W., Gutierrez, J. M. Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. *Biochem J.* v. 326, n. 3, p. 853-859, set. 1997.

LOMONTE, B., Moreno, E., Tarkowsk, A., Hanson, L. A., Maccarana, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J Biol Chem.* v. 269, n. 47, p. 29867-29873, nov. 1994.

LOWRY, O.H., Rosebrough, N.J. Farral, A.L. Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* v.193, p. 265-75, 1951.

MIRANDA, M. E., Couturier, G. A., Canziani, G. A., Seki, C., Vidal, J. C. Resistance of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops neuwiedii* to the neurotoxicity of massive quantities of Crotalid venom. *Acta Physiol Lat Am.* v. 32, n. 2, p. 103-115, 1982.

MOLINA, F. LAUNE D, GOUGAT, C., PAU, B., GRANIER, C. Improved performances of spot multiple peptide synthesis. *Peptide Research.* v. 9, n. 3, p. 151-155, 1996 .

MONTECUCCO, C., Rossetto, O. How do presynaptic PLA₂ neurotoxins block nerve terminals? *Trends Biochem Sci.* v. 25, n. 6, p. 266-270, jun. 2000.

MONTEIRO, H. S. A., Da-Silva, I. M. S. C., Martins, A. M. C., Fonteles, M. C. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 34, n. 10, p. 1347-1352, 2001.

NOBUHISA, I., Inamasu, S., Nakai, M., Tatsui, A., Mimori, T., Ogawa, T., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Hattori, S., Kihara, H., Ohno, M. Characterization and evolution of a gene encoding a *Trimeresurus flavoviridis* serum protein that inhibits basic phospholipase A₂ isozymes in the snake's venom. *Eur J Biochem.* v. 249, n. 3, p.838-845, nov. 1997.

OHKURA, N., Kitahara, Y., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K. Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of the sea krait, *Laticauda semifasciata.* *J Biochem.* v. 125, n. 2, p. 375-382, fev. 1999.

OHKURA, N., Okuhara, H., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K. Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A₂ inhibitors from the blood

plasma of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. *Biochem. J.* v. 325, n. 2, p. 527-531, jul. 1997.

OHKURA, N., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K. The two subunits of a phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of Thailand cobra having structural similarity to urokinase-type plasminogen activator and Ly-6 related proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 204, p. 121-1218, 1994.

OHKURA, N., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K. Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. *J. Biochem.* v. 113, n. 4, p. 413-419, abr. 1993.

OKUMURA, K., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K. Identification of beta-type phospholipase A₍₂₎ inhibitor in a nonvenomous snake, *Elaphe quadrivirgata*. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 408, n.1, p. 124-130, dez. 2002.

OKUMURA, K., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K. cDNA cloning and bacterial expression of phospholipase A₍₂₎ inhibitor PLIalpha from the serum of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*(1). *Biochim Biophys Acta.* v. 1441, 1-n. 1, p. 51-60, out. 1999.

OKUMURA, K., Ohkura, N., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K. A novel phospholipase A₂ inhibitor with leucine-rich repeats from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. Sequence homologies with human leucine-rich alpha₂-glycoprotein. *J Biol Chem.* v. 273, n. 31, p. 19469-19475, jul. 1998.

OVADIA, M., Kochva, E., Moav, B. The neutralization mechanism of *Vipera palaestinae* neurotoxin by a purified factor from homologous serum. *Biochim Biophys Acta*. v. 491, n. 2, p. 370-386, abr. 1977.

PERALES, J., Villela, C., Domont, G. B., Choumet, V., Saliou, B., Moussatche, H., Bon, C., Faure, G. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. *Eur J Biochem*. v. 227, p.19-26, 1995.

RADVANYI, F., Keil, A., Saliou, B., Lembezat, M. P., Bom, C. Binding of divalent and trivalent cations with crotoxin and with its phospholipase and its non-catalytic subunits: effects on enzymatic activity and on the interaction of phospholipase component with phospholipids. *Biochim Biophys Acta*. v. 1006, n. 2, p. 183-192, nov. 1989.

RENETSEDER, R., BRUMIE, S., DIJKSTRA, B.W., DRENTH, J., SIGLER, P.B. A comparison of the crystal structure of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom, *J. Biol. Chem*. V. 260, p.11627-11634, 1995.

RUBSAMEN, K., Breithaupt, H., Habermann, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. v. 270, n. 3, p. 274-288, 1971.

SALVINI, T.F., Amaral, A. C., Miyabara, E. H., Turri, J. A., Danella, P. M., Selistre de Araujo, H. S. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. *Toxicon*. v. 39, n.8, p. 1141-1149, ago. 2001.

SEKI, C., Vidal, J. C., Barrio, A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *Toxicon*. v. 18, n. 3, p. 235-247, 1980.

SILVEIRA, P. V., Nishioka, S. de A. South American rattlesnake bite in a Brazilian teaching hospital. Clinical and epidemiological study of 87 cases, with analysis of factors predictive of renal failure. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. v. 86, n. 5, p. 562-564, set.-out. 1992.

SIMPSON, L. L., LAUTENSLAGER, G. T., KAISER, I. I., MIDDLEBROOK, J.L. Identification of the site at which phospholipase A₂ neurotoxins localize to produce their neuromuscular blocking effects. *Toxicon* v.31, n.6, p. 13-26, jan. 1993

SOARES, A. M., Marcussi, S., Stábeli, R. G., França, S. C., Giglio, J. R., Ward, R. J., Arantes, E. C. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor protein from Bothrops moojeni plasma. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* V. 302, p. 193-200. 2003.

SOARES, A. M., Mancin, A. C., Cecchini, A. L., Arantes, E. C., França, S. C., Gutierrez, J. M., Giglio, J. R. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A₂ subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom,

on its enzymatic and pharmacological activities. *Int J Biochem Cell Biol.* v. 33, n. 9, p.877-888, set. 2001.

THWIN, M. M., Gopalakrishnakone, P., Kini, R. M., Armugam, A., Jeyaseelan, K. Recombinant antitoxic and antiinflammatory factor from the nonvenomous snake *Python reticulatus*: phospholipase A₂ inhibition and venom neutralizing potential. *Biochemistry.* v. 39, n. 31, p. 96049611, ago. 2000.

THWIN, M. M., Gopalakrishnakone, P. Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: a mini review of the recent developments (1991-1997). *Toxicon.* v. 36, n. 11, p. 1471-1482, nov. 1998.

TSAI, I. H., Liu, H. C., Chang, T. Toxicity domain in presynaptically toxic phospholipase A₂ of snake venom. *Biochim Biophys Acta.* v. 916, n. 1, p. 94-99, nov. 1987.

TZENG, M. C., Yen, C. H., Hseu, M. J., Tseng, C. C., Tsai, M. D., Dupureur, C. M. Binding proteins on synaptic membranes for crotoxin and taipoxin, two phospholipases A₂ with neurotoxicity. *Toxicon.* v. 33, n. 4, p. 451-457, abr. 1995a.

TZENG, M. C., Yen, C. H., Hseu, M. J., Dupureur, C. M., Tsai, M. D. Conversion of bovine pancreatic phospholipase A₂ at a single site into a competitor of neurotoxic phospholipases A₂ by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* v. 270, n. 5, p. 2120-2123, fev. 1995b.

VALENTIN, E., Lambeau, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. v. 1488, n. 1-2, p. 59-70, out. 2000.

VITAL BRAZIL, O. Pharmacology of crystalline crotoxin. II Neuromuscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan*. v. 33, p. 981-992, 1966.