

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

TAMIRES DOS SANTOS PASCHOAL

Caracterização bioquímica e funcional de uma Fosfolipase A<sub>2</sub> isolada da  
peçonha de *Bothrops alternatus*

UBERLÂNDIA

2015

TAMIRES DOS SANTOS PASCHOAL

Caracterização bioquímica e funcional de uma Fosfolipase A<sub>2</sub> isolada da  
peçonha de *Bothrops alternatus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira

Co-orientadora: Profª. Ma. Carla Cristine Neves  
Mamede

UBERLÂNDIA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

P279c Paschoal, Tamires dos Santos, 1991-  
2015 Caracterização bioquímica e funcional de uma Fosfolipase A2  
isolada da peçonha de Bothrops alternatus / Tamires dos Santos  
Paschoal. - 2015.  
74 f. : il.

Orientador: Fábio de Oliveira.  
Coorientadora: Carla Cristine Neves Mamede  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Bothrops - Teses. 3. Fosfolipases - Teses. 4.  
Serpente peçonhenta - Teses. I. Oliveira, Fábio de. II. Mamede, Carla  
Cristine Neves. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais pelo carinho e a compreensão de toda uma vida. Sem o cuidado e a dedicação de vocês tenho certeza de que essa conquista não seria possível.

Aos demais familiares que, mesmo de longe, torceram pelo meu sucesso.

Aos meus queridos amigos que dividem comigo tantos momentos, tornando meus dias sempre mais felizes.

Ao meu orientador, Dr. Fábio de Oliveira, pela inestimável contribuição à minha formação acadêmica e pela oportunidade de aprender tanto em seu laboratório.

À minha co-orientadora, Carla Mamede, por todos os ensinamentos, pela atenção e dedicação com a qual me ajudou na concretização desse trabalho.

Aos colegas Alisson Silva, Déborah Pereira, Edigar Dias, Flávia Matsuo, Mariana Matias, Sâmela Vieira e Thalena Zanetti por toda a ajuda e apoio nos experimentos.

Aos demais colegas do laboratório de Biologia Molecular e Celular, Bruna, Kelly, Mayara, Nadia e Thalita, pelos conselhos e pelo companheirismo, dentro e fora do laboratório.

Ao Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde (CEBio, FIOCRUZ-RO); à Universidade Federal de Rondônia – UNIR (Porto Velho-RO); e às Redes de Plataformas Tecnológicas, RPT02I, RPT03D, RPT10B e PDTIS (FIOCRUZ-RO) pela colaboração nos experimentos de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Nanobiofarmacêutica (INCT NanoBiofar) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro na realização dos diversos trabalhos.

A todos os professores e funcionários da Universidade Federal de Uberlândia que contribuíram para minha formação e sobretudo para a realização desse trabalho.

## RESUMO

As fosfolipases A<sub>2</sub> pertencem a uma superfamília de proteínas com funções enzimáticas semelhantes, responsáveis pela hidrólise de fosfolipídeos e, assim, pela liberação de ácidos graxos e lisofosfolipídeos que participam de diversas atividades fisiológicas, como inflamação, ativação plaquetária, sinalização, proliferação e a migração celular. O presente trabalho teve como objetivo a caracterização bioquímica e funcional de uma fosfolipase A<sub>2</sub> ácida isolada da peçonha de *Bothrops alternatus*, denominada BaG2P5. A proteína BaG2P5 foi purificada por meio de três passos cromatográficos em resinas de troca iônica (DEAE-Sephacel), exclusão molecular (Sephadex G75) e interação hidrofóbica (Phenyl-Sepharose). A espectrometria de massas foi utilizada para determinação do grau de pureza e da massa molecular de BaG2P5, que foi de aproximadamente 14 kDa. BaG2P5 apresentou uma potente atividade fosfolipásica tempo e dose-dependentes, avaliada pelo método de hemólise radial em gel, e foi capaz de causar lesão do tecido muscular e recrutar leucócitos quando injetada intramuscularmente em camundongos. Além da miotoxicidade, BaG2P5 apresentou toxicidade *in vitro* sobre culturas de células da linhagem tumoral HeLa, e também efeito inibitório tempo e dose-dependentes sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina. Por outro lado, BaG2P5 não foi capaz de induzir a formação de edema nem a hiperalgesia quando injetada na região intraplanter da pata de ratos. Esses resultados contribuem para os estudos sobre a composição das peçonhas de serpentes e para melhor compreensão do papel das fosfolipases A<sub>2</sub> nos envenenamentos ofídicos. Além disso, a caracterização de toxinas com efeitos antiplaquetário e antitumoral é uma etapa importante para a descoberta de novas moléculas com potencial terapêutico.

**Palavras-chave:** Peçonha de serpente. *Bothrops alternatus*. Agregação plaquetária. Fosfolipases A<sub>2</sub>.

## ABSTRACT

The phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) are part of a superfamily of proteins with similar enzymatic functions, responsible for the hydrolysis of phospholipids and, thus, for the release of fatty acids and lysophospholipids which play a role in various physiological activities, like inflammation, platelet activation, signaling, cell proliferation and migration. The present study aimed at the functional and biochemical characterization of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the *Bothrops alternatus* snake venom, named BaG2P5. BaG2P5 was purified using three chromatographic steps: ion exchange on DEAE-Sephacel, molecular exclusion in Sephadex-G75 and hydrophobic interactions in Phenyl-Sepharose. The mass spectrometry was used to determine the purity and the molecular mass of BaG2P5, which was approximately 14 kDa. The protein showed a potent time and dose-dependent phospholipasic activity, evaluated by indirect hemolysis method, and was able to cause muscle tissue damage and leukocyte recruitment when intramuscularly administered. In addition, BaG2P5 presented *in vitro* toxicity against HeLa cells, and inhibited platelet aggregation induced by epinephrine in a time and dose dependent manner. On the other hand, BaG2P5 could not induce intraplantar edema and hyperalgesia in rat paws. These results contribute for studies on snake venom composition and for better understanding of the role of phospholipases in snake envenoming. Furthermore, the characterization of toxins with anti-platelet and anti-cancer properties is an important step in the discovery of new molecules with therapeutic potential.

**Keywords:** Snake venom. *Bothrops alternatus*. Platelet aggregation. Phospholipases A<sub>2</sub>.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>GRÁFICO 1</b>	Casos de acidentes com serpentes registrados no Brasil no período de 2000 a 2012.	12
<b>QUADRO 1</b>	Efeitos das peçonhas ofídicas de acordo com suas atividades fisiopatológicas.	14
<b>GRÁFICO 2</b>	Perfil proteômico da peçonha de <i>B. alternatus</i> .	17
<b>FIGURA 1</b>	Hidrólise de fosfatidilcolina por PLA <sub>1</sub> , PLA <sub>2</sub> , PLB, PLC e PLD e os respectivos produtos da reação.	20
<b>FIGURA 2</b>	Representação esquemática do mecanismo de catálise das PLA <sub>2</sub> s.	24
<b>FIGURA 3</b>	Mecanismo catalítico de uma PLA <sub>2</sub> .	24
<b>FIGURA 4</b>	Fracionamento da peçonha bruta de <i>B. alternatus</i> em DEAE Sephadex.	37
<b>FIGURA 5</b>	Perfil em SDS-PAGE (14%) das subfrações A3 provenientes da DEAE Sephadex.	38
<b>FIGURA 6</b>	Cromatografia do pico A3c em resina Sephadex G75.	39
<b>FIGURA 7</b>	Perfil em SDS-PAGE (14%) das frações provenientes da cromatografia em Sephadex G75.	40
<b>FIGURA 8</b>	Purificação da fosfolipase A <sub>2</sub> BaG2P5.	41
<b>FIGURA 9</b>	Determinação da massa molecular e do ponto isoelétrico da BaG2P5.	42
<b>FIGURA 10</b>	Atividade hemolítica indireta da BaG2P5.	44
<b>FIGURA 11</b>	Análise em microscopia óptica das lesões musculares induzidas por BaG2P5.	46
<b>FIGURA 12</b>	Efeito da BaG2P5 sobre a formação de edema e limiar nociceptivo.	48
<b>FIGURA 13</b>	Efeito da BaG2P5 sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina.	50
<b>FIGURA 14</b>	Citotoxicidade da BaG2P5 sobre células HeLa.	53

## **LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1</b>	Rendimento do processo de purificação da BaG2P5.	42
<b>TABELA 2</b>	Atividade hemolítica indireta da BaG2P5.	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>Bis-Acrilamida</b>	N, N'-metileno-bis-acrilamida
<b>CHAPS</b>	3-[(3-colamidopropil)-dimetil-amônio]-1-propano-sulfonato
<b>DEAE</b>	Dietilaminoetyl
<b>DFP</b>	Diisopropilfluorofosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>FIOCRUZ-RO</b>	Fundação Oswaldo Cruz – Rondônia
<b>HEPES</b>	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
<b>MALDI</b>	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PAF</b>	<i>Platelet activating factor</i> (Fator ativador de plaquetas)
<b>PAF-AH</b>	Acetilhidrolase de fator ativador de plaquetas
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada em fosfato
<b>pI</b>	Ponto isoelétrico
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipases A <sub>2</sub>
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonil fluoreto
<b>PN-C</b>	Peptídeos natriuréticos do tipo C
<b>PPB</b>	Peptídeos potenciadores de bradicinina
<b>PPP</b>	Plasma pobre em plaquetas
<b>PRP</b>	Plasma rico em plaquetas
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
<b>SINAN</b>	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
<b>svMPs</b>	Metaloproteases de peçonhas de serpentes
<b>svPLA<sub>2</sub>s</b>	Fosfolipases A <sub>2</sub> de peçonhas de serpentes
<b>svSPs</b>	Serinoproteases de peçonhas de serpentes
<b>TOF</b>	Tempo de vôo
<b>Tris</b>	tris(hidroximetil)aminometano

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	11
<b>2.1</b>	<b>Serpentes peçonhentas</b>	11
2.1.1	Aspectos clínicos e fisiopatológicos do acidente ofídico	14
<b>2.2</b>	<b>Composição da peçonha ofídica</b>	16
<b>2.3</b>	<b>Fosfolipases A<sub>2</sub></b>	20
2.3.1	Mecanismo catalítico das sPLA <sub>2</sub> s	23
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	29
<b>3.1</b>	<b>Geral</b>	29
<b>3.2</b>	<b>Específicos</b>	29
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	30
<b>4.1</b>	<b>Peçonha de <i>Bothrops alternatus</i></b>	30
<b>4.2</b>	<b>Animais experimentais</b>	30
<b>4.3</b>	<b>Obtenção do sangue humano</b>	30
<b>4.4</b>	<b>Purificação da fosfolipase A<sub>2</sub></b>	30
<b>4.5</b>	<b>Determinação quantitativa da proteína</b>	31
<b>4.6</b>	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes</b>	32
<b>4.7</b>	<b>Eletroforese bidimensional</b>	32
<b>4.8</b>	<b>Espectrometria de massas</b>	33
<b>4.9</b>	<b>Atividade hemolítica indireta</b>	33
<b>4.10</b>	<b>Atividade miotóxica</b>	33
<b>4.11</b>	<b>Atividade edematógena e hiperalgésica</b>	34
<b>4.12</b>	<b>Ensaio sobre agregação plaquetária</b>	34
<b>4.13</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade sobre células tumorais</b>	35
4.13.1	Cultura de células HeLa	35
4.13.2	Tratamento das células	35
4.13.3	Análise de MTT	36
<b>4.14</b>	<b>Análise estatística</b>	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	37
<b>5.1</b>	<b>Isolamento e caracterização bioquímica da fosfolipase A<sub>2</sub></b>	37
<b>5.2</b>	<b>Atividade hemolítica indireta</b>	43

<b>5.3</b>	<b>Atividade miotóxica</b>	45
<b>5.4</b>	<b>Atividade edemato-gênica e hiperalgésica</b>	47
<b>5.5</b>	<b>Ensaio sobre agregação plaquetária</b>	49
<b>5.6</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade sobre células tumorais</b>	52
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	55
	<b>REFERÊNCIAS</b>	56
	<b>ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética na Utilização de Animais</b>	73

## 1 INTRODUÇÃO

As peçonhas ofídicas são constituídas por uma ampla variedade de moléculas com propriedades bioquímicas distintas. Baseando-se nessa riqueza de compostos biologicamente ativos e na grande diversidade de suas ações, muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de melhor conhecer a composição dessas peçonhas.

Embora as peçonhas comprometam o funcionamento normal do metabolismo de diversos organismos, seus componentes isolados são utilizados como valiosos instrumentos de pesquisa em várias áreas do conhecimento. A purificação e caracterização de moléculas, sobretudo proteínas, provenientes das peçonhas têm contribuído significativamente para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do envenenamento, para o desenvolvimento de métodos e reagentes de diagnóstico e para o tratamento de diversas disfunções. Além disso, o entendimento das relações entre estrutura e função dos componentes ativos das peçonhas auxilia na elaboração de abordagens terapêuticas mais eficazes para o tratamento dos efeitos deletérios do envenenamento.

Uma das classes de proteínas mais abundantes na peçonha de *Bothrops alternatus* é a das fosfolipases A<sub>2</sub>. Essas enzimas possuem uma variedade de atividades farmacológicas, como miotóxica, neurotóxica, proinflamatória, hipotensiva, hemolítica, anticoagulante, antiagregante, antitumoral e citotóxica. Assim, os estudos funcionais e estruturais das fosfolipases A<sub>2</sub> contribuem para melhor compreensão de suas propriedades e apresentam possíveis aplicações farmacológicas e biotecnológicas para essas novas ferramentas.

Tendo em vista essas características das fosfolipases A<sub>2</sub>, o presente trabalho descreve a purificação e a caracterização de uma fosfolipase A<sub>2</sub> da peçonha de *B. alternatus*, com o objetivo de avaliar seus efeitos em diversos processos enzimáticos e biológicos.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação do Prof. Dr. Fábio de Oliveira. O trabalho contou com a colaboração do Dr. Andreimar Martins Soares, do Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde (CEBio) – FIOCRUZ-RO, responsável pelos experimentos de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Serpentes peçonhentas

No Brasil, existem, atualmente 386 espécies de serpentes descritas (COSTA; BÉRNILS, 2014). Apesar da grande variedade, apenas as espécies pertencentes às famílias Elapidae e Viperidae são consideradas importantes para a saúde pública, pois provocam envenenamentos graves em humanos e em animais de interesse econômico. Cerca de 70 espécies compreendidas nessas famílias estão distribuídas em seis gêneros, a saber: *Micrurus* e *Leptomicrurus* (Elapidae) e *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Lachesis* e *Crotalus* (Viperidae) (COSTA; BÉRNILS, 2014).

A maioria das serpentes de importância para a saúde pública tem hábitos terrícolas e noturnos. Podem ser encontradas em ambientes úmidos, como matas, e em áreas rurais, nas proximidades de depósitos de lixo e entulho ou de armazenamento de grãos, locais de proliferação das suas principais presas, os roedores (ratos e camundongos) (BRASIL, 2009; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003). As serpentes peçonhentas têm o hábito de permanecerem enrodilhadas e imóveis, camufladas às margens de trilhas e próximas a roças, galpões e bambuzais, em busca de roedores. Esse comportamento facilita a ocorrência de acidentes, sobretudo nas épocas de calor e chuvas, nas quais a atividade humana no campo é maior (BRASIL, 2009).

O gênero *Bothrops* comprehende cerca de 27 espécies, distribuídas por todo território nacional, e são popularmente chamadas de jararaca, jararacuru, urutu e caiçaca (BRASIL, 2009). Dentre as espécies mais conhecidas está a *B. jararaca*, distribuída na região sul e sudeste, ocupando áreas silvestres, agrícolas e periurbanas. A serpente *B. jararacussu* é predominantemente encontrada no sul e sudeste e pode alcançar maior comprimento (até 1,8 m). A espécie *B. moojeni* é encontrada nas regiões sul, sudeste e também no estado da Bahia. É a principal espécie do cerrado, com comportamento agressivo e porte avantajado (BARRAVIERA, 1991; BRASIL, 2009). As serpentes do gênero *Bothrops* têm comportamento muito agressivo quando se sentem ameaçadas e estima-se que sejam causadoras de aproximadamente 74% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil, especialmente na região Sudeste (BRASIL, 2009).

A espécie *B. alternatus*, conhecida popularmente como “urutu”, “urutu-cruzeira” ou “cruzeira”, é encontrada nos estados de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e tem alta prevalência no Triângulo Mineiro –

MG (NISHIOKA; SILVEIRA, 1992). Essa serpente apresenta um padrão de cor característico, com manchas “em forma de ferradura” no dorso e a porção ventral esbranquiçada ou creme (TOKARNIA; PEIXOTO, 2006).

Os acidentes ofídicos representam um sério problema para a saúde pública nos países tropicais e subtropicais, devido à alta frequência com que ocorrem e a alta mortalidade decorrente, embora sejam bastante negligenciados pelos órgãos e autoridades competentes (GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006; PINHO; PEREIRA, 2001). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os acidentes ofídicos afetam mais de 1,5 milhão de pessoas anualmente no mundo, causando lesões graves e resultando em aproximadamente 20 mil mortes por ano (KASTURIRATNE et al., 2008; OMS, 2008; WHITE, 2005).

No Brasil, os estudos epidemiológicos apontam para um perfil estável (Gráfico 1), no qual ocorrem de 25 a 30 mil acidentes ofídicos por ano, com letalidade em torno de 0,4% (BRASIL, 2014a, 2014b). Os registros do Ministério da Saúde contabilizaram um total de 29322 acidentes em 2012 e 129 óbitos (BRASIL, 2014a, 2014b). A análise dos dados coletados a partir de 2000 mostra um aumento progressivo do número de notificações de acidentes ofídicos, sendo que o maior índice foi registrado em 2011, com 31149 casos e 143 óbitos (BRASIL, 2014a, 2014b). No entanto, esses números podem estar subestimados, uma vez que a desvalorização da informação por parte das instituições e profissionais de saúde leva a uma subnotificação dos acidentes registrados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (BRASIL, 2009).

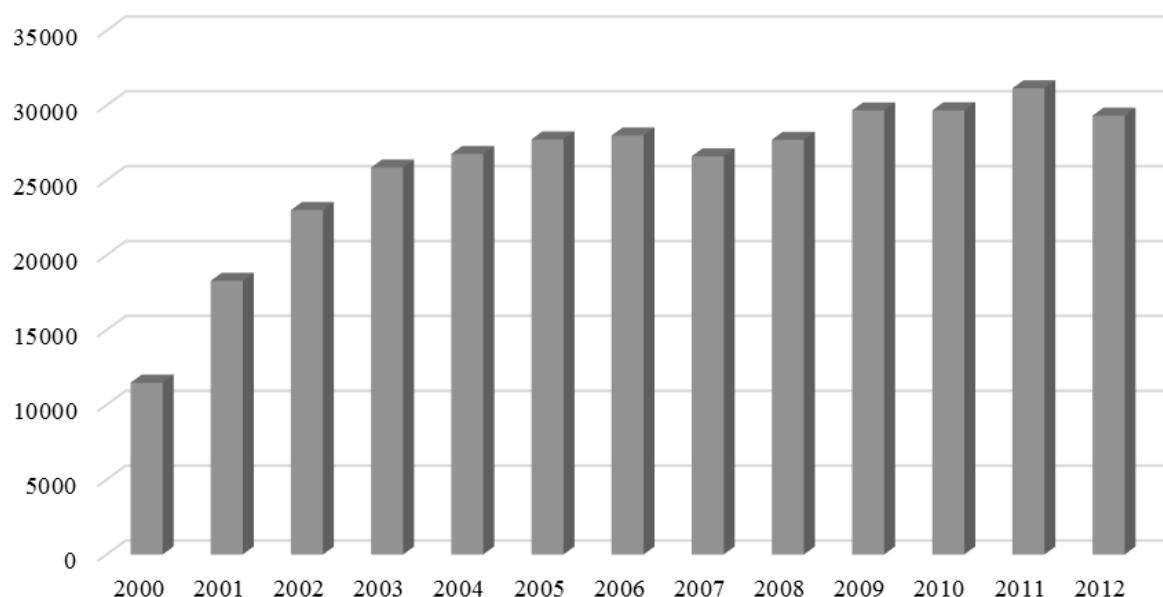


Gráfico 1 – Casos de acidentes com serpentes registrados no Brasil no período de 2000 a 2012. Fonte: adaptado de Brasil, 2014a.

A ocorrência de acidentes ofídicos está relacionada a fatores climáticos e às atividades humanas e das serpentes, caracterizando-se por uma sazonalidade marcante. No Brasil, a presença do homem nos trabalhos do campo é maior nos meses mais quentes e chuvosos, época na qual também aumentam as atividades das serpentes, quando estão à procura de alimento e parceiros para acasalar. Além disso, as serpentes são animais ectotérmicos e, por isso, reduzem seu metabolismo em baixas temperaturas. Assim, os períodos mais quentes favorecem o encontro de humanos e serpentes, levando ao aumento dos casos de ofidismo no início e no final do ano em nosso país, especialmente nas regiões Sul e Sudeste (BRASIL, 2009).

A relação com o trabalho na zona rural também influencia no perfil das vítimas dos acidentes ofídicos. A faixa etária acometida varia entre 15 e 49 anos, com predomínio de trabalhadores rurais do sexo masculino, atingidos, preferencialmente, nos membros inferiores (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; BRASIL, 2009).

Nas regiões rurais, onde se concentram a maior parte das vítimas, o acesso a serviços de saúde é difícil e, muitas vezes, os serviços oferecidos são precários, com carência até mesmo do principal tratamento específico disponível, o soro antiofídico (KASTURIRATNE et al., 2008). Dessa forma, as taxas de morbidade e mortalidade nessas regiões acabam sendo maiores. Na maioria dos casos os acidentes ofídicos acometem populações pobres moradoras de zonas rurais, e, apesar do seu impacto socioeconômico, não recebem a devida atenção das autoridades. Por isso, o envenenamento por picada de serpente está presente na lista de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Além disso, muitas vítimas de ofidismo são jovens que devido a sequelas oriundas da necrose tecidual local, como amputação parcial ou total de membros, podem se tornar inválidos em seus postos de trabalho e, assim, deixar de integrar a parcela da população economicamente ativa. Dessa forma, os acidentes ofídicos não são apenas um problema para a saúde pública, mas também um problema social devido ao impacto econômico e psicológico sobre os indivíduos acometidos (KASTURIRATNE et al., 2008).

Embora a letalidade do acidente com serpentes do gênero *Bothrops* seja baixa (em torno de 0,3%), as sequelas relacionadas aos efeitos no local da picada são graves e ocorrem em cerca de 10% dos acidentes botrópicos. Alguns fatores de risco como o uso de torniquetes e a demora na administração do soro antiofídico podem, ainda, agravar as complicações locais (BRASIL, 2009).

### 2.1.1 Aspectos clínicos e fisiopatológicos do acidente ofídico

A caracterização e distinção dos acidentes ofídicos podem ser determinadas com base na composição qualitativa e quantitativa da peçonha, a qual está diretamente ligada a diversos fatores como espécie da serpente, idade, alimentação, caráter individual, distribuição geográfica e o período do ano em que foi feita a coleta (BARRAVIERA, 1999; CARDOSO et al., 2003; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

Muitas vezes a espécie causadora do acidente ofídico não é identificada. Nesses casos, o diagnóstico do tipo de envenenamento é baseado em manifestações clínicas e critérios epidemiológicos. Segundo Brasil (2009), os principais efeitos dos envenenamentos estão resumidos no Quadro 1. Os mecanismos de ação das peçonhas ofídicas variam de um gênero para outro, permitindo, assim, sua classificação conforme os efeitos fisiopatológicos locais e sistêmicos observados após a picada (BRASIL, 2009).

Atividades	Peçonhas	Efeitos
Inflamatória aguda	Botrópica e laquética	Lesão endotelial, necrose e liberação de mediadores inflamatórios
Coagulante	Botrópica, laquética e crotálica	Incoagulabilidade sanguínea
Hemorrágica	Botrópica e laquética	Sangramentos na região da picada e à distância
Neurotóxica	Crotálica e elapídica	Bloqueio da junção neuromuscular
Miotóxica	Crotálica	Mialgia e mioglobinúria

Quadro 1 – Efeitos das peçonhas ofídicas de acordo com suas atividades fisiopatológicas. Fonte: adaptado de Brasil, 2009.

No Brasil, apesar da grande variedade de espécies de serpentes, apenas quatro tipos de acidente ofídico são de interesse para a saúde pública: o botrópico, que corresponde a 74% dos casos notificados, o crotálico (7,5%), laquético (3,0%) e elapídico (0,7%) (BRASIL, 2009). Embora os índices de letalidade sejam maiores nos acidentes atribuídos a serpentes dos gêneros *Crotalus* (1,9%) e *Lachesis* (0,9%), os casos com o gênero *Bothrops* levam a maiores danos teciduais no local da picada e, portanto, constituem um problema mais grave para a saúde pública (CARDOSO et al., 2003).

As manifestações fisiopatológicas do envenenamento causado pela peçonha da serpente dependem da ação combinada de seus componentes. Em geral, as peçonhas do gênero *Bothrops* induzem reações locais imediatas e efeitos sistêmicos. Nos casos de acidentes botrópicos, os principais efeitos incluem intenso processo inflamatório no local da

picada, com edema, dor e equimose que se evidenciam nas primeiras horas e progridem ao longo do membro acometido. A ação proteolítica e tóxica dos componentes da peçonha causa intenso dano tecidual, podendo levar ao surgimento de bolhas com conteúdo seroso ou sero-hemorrágico que evoluem para necrose cutânea e muscular. A ocorrência de necrose favorece o aparecimento de complicações secundárias, como infecções seguidas por amputações e perda funcional do membro (BRASIL, 2009).

As principais manifestações sistêmicas dos acidentes botrópicos são relacionadas a distúrbios de coagulação sanguínea, com presença de equimoses distantes do local da picada, hematúria, hematêmese e hemorragias intensas em mucosas e cavidades. Além disso, as vítimas podem apresentar complicações como hipotensão e hipovolemia, decorrente da perda de líquidos e de sangramentos, que podem contribuir para um quadro de choque e insuficiência renal aguda associada a problemas cardiovasculares (BRASIL, 2009; CAMEY; VELARDE; SANCHEZ, 2002; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989; WHITE, 2005; ZYCHAR et al., 2010).

Apesar de uma das características mais marcantes dos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* ser a inflamação local, seus efeitos não são completamente combatidos pelos tratamentos convencionais, uma vez que as toxinas da peçonha botrópica agem rapidamente no tecido afetado e estimulam a liberação de mediadores inflamatórios endógenos antes que o soro possa neutralizar os componentes da peçonha. Curiosamente, algumas das principais moléculas envolvidas na inflamação, as fosfolipases A<sub>2</sub>, possuem baixa imunogenicidade e, portanto, não induzem resposta imune nos equinos durante o processo de produção do soro antiofídico (ESPINO-SOLIS et al., 2009; GUTIÉRREZ et al., 2007; OLIVO et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2009).

Além das fosfolipases A<sub>2</sub>, o processo inflamatório induzido pela peçonha botrópica envolve também a participação de diversos mediadores, como fator ativador de plaquetas (PAF), serotonina e histamina, além de eicosanóides, derivados do ácido araquidônico, e mediadores α e β-adrenérgicos, atuando local e sistemicamente (CHAVES; BARBOZA; GUTIÉRREZ, 1995; MOREIRA et al., 2009; TREBIEN; CALIXTO, 1989).

Dessa forma, a melhor compreensão dos mecanismos de ação das fosfolipases A<sub>2</sub> durante os processos inflamatórios desencadeados por peçonhas ofídicas pode auxiliar no entendimento dos efeitos deletérios dessas peçonhas nos organismos afetados.

Além disso, a disponibilização de tratamento específico é um dos fatores capazes de minimizar a gravidade dos acidentes ofídicos, juntamente com a melhora e maior agilidade nos atendimentos. Apesar de todos os avanços conseguidos na área, o principal tratamento

para os envenenamentos de serpentes continua sendo a administração intravenosa de soro antiofídico específico derivado de equinos. Embora a capacidade de produção de soro seja, atualmente, suficiente para atender a demanda e o soro seja eficaz na atenuação dos efeitos sistêmicos das peçonhas ofídicas, esta forma de tratamento apresenta várias limitações, como dificuldade na neutralização dos efeitos locais, riscos de complicações oriundas da administração do soro e ineficácia contra componentes da peçonha pouco imunogênicos (BRASIL, 2009).

## 2.2 Composição da peçonha ofídica

A diversidade de funções biológicas, bioquímicas e farmacológicas das peçonhas ofídicas é consequência da presença de componentes altamente bioativos adquiridos durante diversas fases do processo de evolução, o que garantiu uma mistura heterogênea de substâncias de natureza proteica ou não proteica bastante tóxica e eficaz para as serpentes naturalmente selecionadas (KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006). A maioria dos compostos encontrados nas peçonhas ofídicas são proteínas com propriedades enzimáticas, pertencentes a diferentes classes, que têm sido amplamente utilizadas em estudos de mecanismos de ação e na busca por modelos para novos fármacos (DENEGRI et al., 2014; HARVEY, 2014; SALVADOR et al., 2011).

A peçonha de serpentes consiste em uma complexa mistura de proteínas, peptídeos, lipídios, polissacarídeos e substâncias químicas inorgânicas. Contudo, proteínas e peptídeos estão presentes em maiores proporções, chegando a compor de 90-95% do seu peso seco (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991). Os componentes inorgânicos mais frequentes são íons metálicos, como cálcio, cobre, ferro, potássio, manganês, sódio, fósforo e zinco, os quais ajudam a manter a estabilidade estrutural de determinadas proteínas ou atuam como catalisadores em reações enzimáticas (BJARNASON; FOX, 1988). Os componentes proteicos incluem uma enorme variedade de substâncias farmacologicamente ativas e com propriedades distintas que atuam individual ou sinergicamente na indução das alterações fisiopatológicas locais e sistêmicas decorrentes do envenenamento (CARDOSO et al., 2010; GOMES et al., 2011). O estudo dos componentes da peçonha e seus efeitos sobre o organismo afetado apresenta um papel fundamental na compreensão da sintomatologia dos envenenamentos botrópicos e dos mecanismos de ação desses componentes, bem como na investigação do seu potencial terapêutico (CINTRA et al., 2012; KAMIGUTI et al., 1996; LEME et al., 2011).

De forma geral, as peçonhas botrópicas apresentam grandes quantidades de componentes proteicos enzimáticos, como as metaloproteases (BALDO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2000; SOUZA et al., 2012), serinoproteases (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000; SERRANO; MAROUN, 2005; VALERIANO-ZAPANA et al., 2012), fosfolipases A<sub>2</sub> (ABREU et al., 2007; FONTES et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2009), fosfodiesterases (MITRA; BHATTACHARYYA, 2014; TRUMMAL et al., 2014), L-aminoacido-oxidases (CISCOTTO et al., 2009; TÖNISMÄGI et al., 2006), nucleosidases (OUYANG; HUANG, 1983; TRUMMAL et al., 2015) e hialuronidas (CASTANHEIRA et al., 2014; KEMPARAJU; GIRISHY, 2006) e não enzimáticos, como as desintegrinas (KAMIGUTI; ZUZEL; THEAKSTON, 1998; USAMI et al., 1994; WENSON et al., 2004) e lectinas (CLEMETSON et al., 2001; HIRABAYASHI; KUSUNOKI; KASAI, 1991).

A análise transcriptômica da expressão gênica na glândula de peçonha de *B. alternatus* mostrou uma predominância de metaloproteases/desintegrinas, seguidas por peptídeos potenciadores de bradicinina/peptídeos natriuréticos do tipo C, fosfolipases A<sub>2</sub>, serinoproteases e lectinas do tipo C (Gráfico 2) (CARDOSO et al., 2010). Diversos desses componentes interferem no sistema hemostático, um mecanismo de defesa fundamental nos vertebrados que envolve a formação do coágulo ou trombo, impedindo a perda de sangue mediante uma injúria vascular e o processo de dissolução do trombo ou fibrinólise após o reparo das células endoteliais (GENTRY, 2004). Outros componentes, como as fosfolipases A<sub>2</sub>, estão ativamente envolvidos no processo inflamatório que se inicia no local da picada, podendo ou não se disseminar sistemicamente.

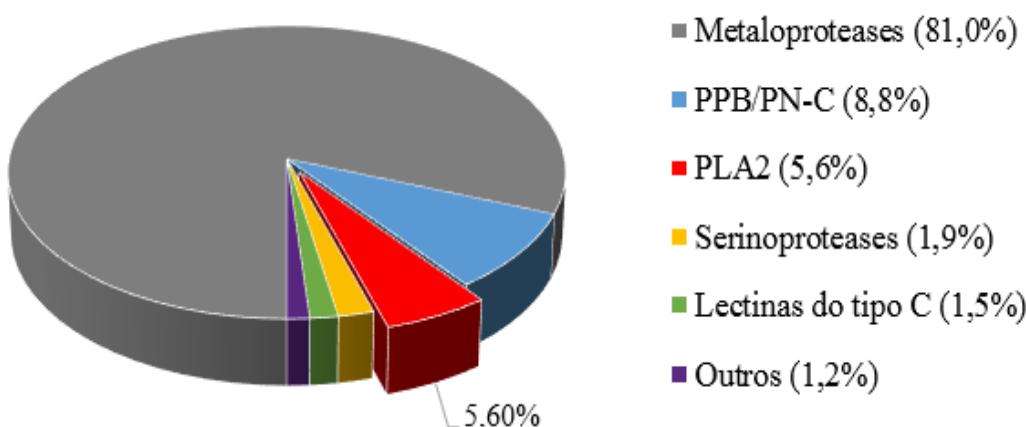


Gráfico 2 – Perfil proteómico da peçonha de *B. alternatus*. A ocorrência relativa das diferentes classes de toxinas identificadas na sua constituição, expressa em porcentagem, está exibida entre parênteses. Abreviações: PPB: peptídeos potenciadores de bradicinina; PN-C: peptídeos natriuréticos do tipo C; PLA2: fosfolipases A<sub>2</sub>. Fonte: adaptado de Cardoso et al., 2010.

As metaloproteases de peçonhas de serpentes (*snake venom metalloproteinases – svMPs*) são caracterizadas pela dependência catalítica de íons metálicos ( $Zn^{2+}$ ) e por uma forte ação fibrinogenolítica, interferindo também na cascata de coagulação, na agregação plaquetária e em mecanismos inflamatórios (FOX; SERRANO, 2005; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000). Essas enzimas degradam as cadeias A $\alpha$  e B $\beta$  do fibrinogênio, embora geralmente tenham preferência ou exclusividade pela primeira (SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011). As svMPs também evitam a formação de trombos e degradam coágulos de fibrina, tornando o estudo de tais enzimas relevante para o avanço dos tratamentos clínicos no combate a desordens tromboembolíticas (DEITCHER; TOOMBS, 2005; LEONARDI et al., 2007).

As metaloproteases são secretadas na forma de zimogênios (MATRISIAN, 1990) e podem ser inibidas por agentes quelantes como o EDTA e a 1,10-fenantrolina, que eliminam completamente sua atividade (BJARNASON; FOX, 1988). Vários estudos demonstram que a presença dos domínios não enzimáticos, como os desintegrina-like e rico em cisteína, por exemplo, potencializa os efeitos das svMPs pela associação desses domínios a componentes celulares, facilitando a proteólise (KAMIGUTI et al., 1996; SERRANO et al., 2005).

As desintegrinas constituem uma família de peptídeos (40 – 100 aminoácidos) ricos em cisteína que foram descritos pela primeira vez como potentes inibidores do receptor de fibrinogênio das plaquetas, a integrina  $\alpha IIb\beta 3$  (CALVETE et al., 2005; HUANG et al., 1987).

As serinoproteases de peçonhas de serpentes (*snake venom serine proteinases – svSPs*) geralmente são glicoproteínas de cadeia única com grande diversidade de substratos e região catalítica altamente conservada (Ser<sup>195</sup>, His<sup>57</sup> e Asp<sup>102</sup>) (SERRANO; MAROUN, 2005). Essas enzimas possuem um resíduo de serina altamente reativo, o qual exerce um papel crítico em sua atividade catalítica. Os inibidores de serinoproteases, como o diisopropilfluorofosfato (DFP), a benzamidina e o fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), reagem com a serina do sítio ativo, inativando irreversivelmente essas proteases (KAMIGUTI; SANO-MARTINS, 1995).

Assim como as svMPs, as svSPs são sintetizadas como zimogênios e interferem na agregação plaquetária, no sistema fibrinolítico e na pressão sanguínea (KINI, 2005; PIRKLE, 1998). A maioria das svSPs fibrino(geno)líticas degradam preferencialmente a cadeia B $\beta$  do fibrinogênio e tem pouca atividade sobre a cadeia A $\alpha$  (SWENSON; MARKLAND, 2005), embora algumas serinoproteases, como a Bhalternina isolada de *B. alternatus* (COSTA et al., 2010), possam degradar apenas a cadeia A $\alpha$  do fibrinogênio (SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011).

Além disso, muitas serinoproteases apresentam ação anticoagulante devido à degradação proteolítica de componentes do sistema hemostático e pela ativação ou inibição específica de fatores da coagulação e fibrinólise (BRAUD; BON; WISNER, 2000; COSTA et al., 2010; MARSH; WILLIAMS, 2005). Por exemplo, as serinoproteases semelhantes à trombina (*thrombin-like*) são capazes de clivar os fibrinopeptídeos A $\alpha$  e/ou B $\beta$  do fibrinogênio, o que desencadeia a formação de um coágulo “frouxo” que é rapidamente degradado *in vivo* por fibrinólise (MAGALHÃES et al., 2007; MARKLAND, 1998). Essa ação promove a depleção dos estoques endógenos de fibrinogênio e permite a utilização daquelas serinoproteases como agentes antitrombóticos e anticoagulantes (PÉREZ et al., 2008; ROCHA; FURTADO, 2005).

A grande variedade de compostos presentes em peçonhas de serpentes vem despertando o interesse de vários pesquisadores a fim de entender sua ação sistêmica assim como suas propriedades terapêuticas e aplicações farmacológicas (GOMES et al., 2011; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; SWENSON; MARKLAND, 2005). Ferreira, Bartelt e Greene (1970) demonstraram o alto potencial farmacológico desses compostos ao isolarem da peçonha de *B. jararaca* a molécula que deu origem a um popular medicamento anti-hipertensivo, o qual recebeu o nome comercial de Captopril®. Esse peptídeo de baixo peso molecular afeta diretamente a pressão sanguínea ao inibir a enzima conversora de angiotensina, causando, assim, a vasodilatação responsável pela redução dos níveis pressóricos sistêmicos.

Uma substância de igual importância é a Ancrod, um agente de ação fibrinolítica desenvolvido a partir da peçonha de *Agkistrodon rhodostoma*, utilizado como agente desfibrinogenante no tratamento de trombose venosa profunda e também de obstruções coronarianas (STOCKER; BARLOW, 1976). Outra aplicação de destaque para os componentes da peçonha ofídica é a “cola de fibrina”, um material sintetizado a partir de uma *thrombin-like* da peçonha de *Crotalus* (JUAN et al., 1995) que tem se mostrado um medicamento eficiente, usado para interrupção do extravasamento sanguíneo em procedimentos cirúrgicos e na reparação de tecidos e nervos (WANG; PINS; SILVER, 1995).

O desenvolvimento dessas moléculas serviu como inspiração para estudos funcionais e estruturais das toxinas de serpentes que representam uma importante via de compreensão das propriedades desses componentes, mostrando várias aplicações farmacológicas e biotecnológicas (PAL et al., 2002; SOARES, 2012). Diversas pesquisas recentes, utilizando toxinas de serpentes, têm revelado modelos para o desenvolvimento de novas e mais eficientes ferramentas terapêuticas, utilizadas como tratamentos alternativos para doenças

cardiovasculares e distúrbios de coagulação, e como analgésicos, antitumorais, antiparasitários, antifúngicos, antimicrobianos, dentre outros (CASTANHEIRA et al., 2015; FALCAO et al., 2014; FUNG; LEE; TAN, 2015; LUCENA et al., 2015; NUNES et al., 2013; SAMY et al., 2014).

### 2.3 Fosfolipases A<sub>2</sub>

As fosfolipases constituem uma classe de proteínas designadas de acordo com o sítio de clivagem sobre o qual atuam, podendo ser classificadas como do tipo A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C e D (Figura 1) (MACÊDO, 2011).

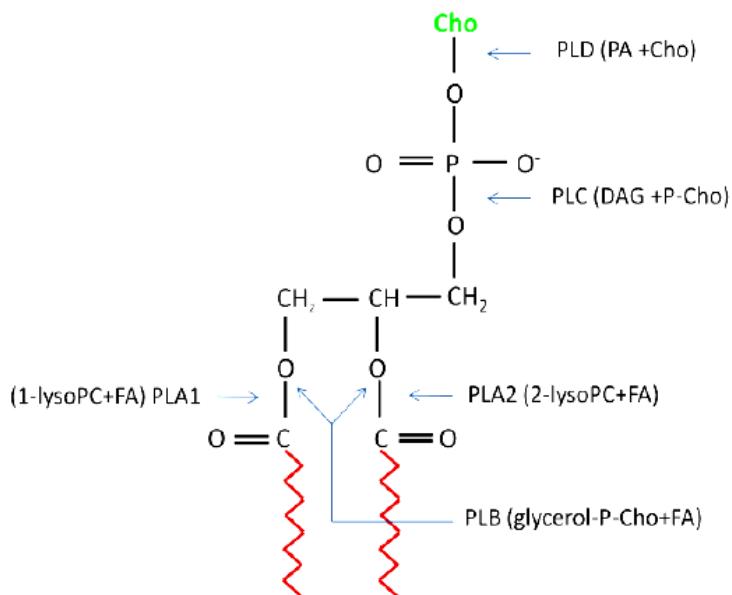


Figura 1 – Hidrólise de fosfatidilcolina por PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub>, PLB, PLC e PLD e os respectivos produtos da reação. As PLA<sub>2</sub>s hidrolisam a ligação *sn*-2 do fosfolipídeo, liberando ácido graxo e lisofosfolipídeos como produtos. Cho: colina, DAG: diacilglicerol. P-Cho: fosfocolina, FA: ácido graxo. Em vermelho, estão destacados os ácidos graxos e, em verde, o grupo polar associado ao fosfato (Fonte: Macêdo, 2011).

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s; EC 3.1.1.4) compreendem uma grande família de proteínas com funções enzimáticas semelhantes e que demonstram uma considerável homologia quanto à sequência de aminoácidos. As PLA<sub>2</sub>s são enzimas que catalisam a hidrólise específica da ligação 2-acyl-éster na posição *sn*-2 de fosfolipídeos, promovendo a liberação de ácidos graxos e lisofosfolipídeos, como ácido araquidônico e ácido lisofosfatídico, respectivamente (ARNI; WARD, 1996; KINI; EVANS, 1989; SETÚBAL et al., 2013).

Os ácidos graxos liberados são precursores de lipídeos bioativos e potenciais mediadores da inflamação, dor e ativação plaquetária, como os eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanas, prostaciclinas e leucotrienos) (DENNIS, 1997). Já os lisofosfolipídeos participam da remodelagem dos fosfolipídeos de membrana e do processo de sinalização celular, atuando também como precursores de mediadores lipídicos relacionados com a proliferação, sobrevivência e a migração celular (SCHALOSKE; DENNIS, 2006; SIX; DENNIS, 2000).

Dessa forma, a hidrólise de fosfolipídeos está relacionada a importantes atividades farmacológicas das PLA<sub>2</sub>s, tais como efeito sobre plaquetas, atividade anticoagulante e hipotensiva, indução de edema, neurotoxicidade, cardiotoxicidade e miotoxicidade (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003; KINI, 2003; OHNO et al., 2003; SANTOS-FILHO et al., 2008). A variedade de funções das PLA<sub>2</sub>s deriva de um processo micro-evolucionário acelerado, através do qual ocorreu uma alta taxa de substituições de aminoácidos em regiões moleculares localizadas, principalmente, na superfície dessas moléculas (KINI; CHAN, 1999; PONCE-SOTO et al., 2007).

As PLA<sub>2</sub>s despertam o interesse médico-científico devido à sua relação com uma grande variedade de doenças inflamatórias humanas e ao seu papel nos envenenamentos ofídicos. Estas enzimas também participam do catabolismo de lipídeos da dieta e do metabolismo geral de lipídeos estruturais de membranas celulares (DENEGRI et al., 2010). As PLA<sub>2</sub>s são encontradas em diversos organismos vivos e têm sido identificadas e caracterizadas em tecidos de mamíferos e em peçonhas de serpentes, artrópodes e moluscos (HIGUCHI et al., 2007; MAITY et al., 2007; SUZUKI et al., 2000; XIN et al., 2009; ZOUARI-KESSENTINI et al., 2009).

As PLA<sub>2</sub>s são classificadas conforme sua localização celular, origem, sequência de aminoácidos, massa molecular, mecanismo catalítico e necessidade de cálcio para atividade enzimática (SETÚBAL et al., 2013; SIX; DENNIS, 2000). Baseando-se em sua localização, as PLA<sub>2</sub>s podem ser consideradas intracelulares ou extracelulares. As PLA<sub>2</sub>s intracelulares, frequentemente, estão associadas a membranas e envolvidas no metabolismo de fosfolipídeos e outras funções celulares (MUKHERJEE; MIELE; PATTABIRAMAN, 1994). Por outro lado, as PLA<sub>2</sub>s extracelulares estão amplamente distribuídas em diversos fluidos biológicos, como em secreções pancreáticas, exsudatos inflamatórios e, em especial, nas peçonhas de serpentes, exercendo diversas funções (DENNIS, 1994).

Schaloske e Dennis (2006) propuseram a atual classificação das PLA<sub>2</sub>s com base em sua origem, seu mecanismo catalítico e suas características funcionais e estruturais, seguindo

a designação por algarismos romanos e letras arábicas pré-estabelecida. De acordo com essa classificação, a superfamília das PLA<sub>2</sub>s pode ser dividida em 15 grupos (GI-GXV) e seus subgrupos, e inclui cinco tipos distintos de enzimas. Esses cinco tipos fundamentais são as PLA<sub>2</sub>s citosólicas (cPLA<sub>2</sub>s), as PLA<sub>2</sub>s independentes de Ca<sup>2+</sup> (iPLA<sub>2</sub>s), as acetilhidrolases de fatores ativadores de plaquetas (*Platelet-activating factor acetylhydrolase* – PAF-AH) e as PLA<sub>2</sub>s lisossomais, destacando-se também as PLA<sub>2</sub>s secretadas (sPLA<sub>2</sub>s) encontradas nas peçonhas ofídicas (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As cPLA<sub>2</sub>s são proteínas citosólicas grandes, com massa molecular variando entre 61 e 114 kDa, cujo sítio catalítico apresenta resíduos de serina e aspartato e que hidrolisam preferencialmente fosfolipídeos contendo ácido araquidônico na posição *sn*-2 (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). Embora não dependam de Ca<sup>2+</sup> para sua catálise, as cPLA<sub>2</sub>s necessitam do íon para se translocarem para membranas intracelulares através do domínio C2. Pertencem aos grupos IVA, IVB, IVC, IVD, IVE e IVF, sendo subdivididas de acordo com semelhanças na estrutura primária.

As cPLA<sub>2</sub>s são encontradas em plaquetas e monócitos e podem ser ativadas por estímulos relacionados à transdução de sinais (CLARK et al., 1991). Além de sua atividade catalítica, as cPLA<sub>2</sub>s apresentam papel significativo no remodelamento de fosfolipídeos nas células, na isquemia do miocárdio (HAZEN; FORD; GROSS, 1991), na liberação do ácido araquidônico (LEHMAN et al., 1993; PONZONI; CORNAGLIA-FERRARIS, 1993) e na secreção de insulina (GROSS et al., 1993; RAMANADHAM et al., 1993).

As iPLA<sub>2</sub>s são enzimas independentes de cálcio que apresentam massa molecular entre 28 e 146 kDa e possuem um resíduo de serina no sítio catalítico, cujo mecanismo enzimático não depende de Ca<sup>2+</sup>. Podem ser subdivididas nos grupos VIA-1, VIA-2, VIB, VIC, VID, VIE e VIF. As iPLA<sub>2</sub>s participam da liberação de ácido araquidônico, do relaxamento da musculatura vascular mediada por acetilcolina e do processo de apoptose (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As acetilhidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH) apresentam um resíduo de serina no sítio catalítico e receberam esse nome por hidrolisarem o grupo acetil da posição *sn*-2 dos fatores ativadores de plaquetas. Pertencem aos grupos VIIA, VIIB, VIIIA e VIIIB (intracelulares). As enzimas do grupo VIIA apresentam uma tríade catalítica com resíduos de serina, histidina e aspartato e são secretadas, enquanto as representantes dos demais grupos são intracelulares. As PAF-AH são abundantes no sistema nervoso central de mamíferos e podem ter um papel no desenvolvimento cerebral (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As PLA<sub>2</sub>s lisossomais pertencem ao grupo XV e possuem resíduos de histidina e aspartato conservados, sugerindo a presença da tríade catalítica Ser-His-Asp. Essas enzimas são encontradas nos lisossomos, são independentes de Ca<sup>2+</sup> e o pH ótimo para sua atividade é próximo a 4,5 (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). Foram primeiramente purificadas a partir de cérebro bovino e são capazes de esterificar o grupo acila da posição *sn*-2 do fosfolipídeo com o grupo hidroxila na posição C-1 de ceramida (BURKE; DENNIS, 2009).

As pequenas sPLA<sub>2</sub>s representam o tipo mais diversificado e bem descrito, possuem massa molecular entre 13 e 19 kDa e de 5 a 8 ligações dissulfeto. Essas enzimas apresentam um resíduo de histidina no sítio ativo, próximo do qual há um aspartato conservado, e requerem a presença de Ca<sup>2+</sup> para sua catálise. São encontradas em plantas, insetos, moluscos, répteis, mamíferos, vírus e bactérias, e podem ser subdivididas nos grupos IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII e XIV de acordo com sua origem, massa molecular e quantidade de pontes dissulfeto (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). As sPLA<sub>2</sub>s possuem uma grande variedade de funções biológicas, tendo sido descritas em processos de digestão, de produção de mediadores lipídicos, de proliferação e regulação celular, exocitose e em diversas doenças inflamatórias (BURKE; DENNIS, 2009).

### 2.3.1 Mecanismo catalítico das sPLA<sub>2</sub>s

Os determinantes estruturais das atividades enzimáticas e biológicas das PLA<sub>2</sub>s foram discutidos por diversos autores (CHIOATO; WARD, 2003; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; LOMONTE; ÂNGULO; CALDERON, 2003; SOARES; GIGLIO, 2003). Ainda não há um consenso sobre quais são as bases estruturais de PLA<sub>2</sub>s que permitem que elas apresentem a diversidade de atividades evidenciadas. Portanto, as investigações sobre as relações existentes entre atividade catalítica e estrutura, bem como os sítios de ligação ou receptores de membrana serão úteis para a compreensão do papel dessas enzimas nos organismos em que são encontradas e naqueles afetados pelos envenenamentos ofídicos (DU et al., 2006).

Um dos mecanismos enzimáticos pelos quais as PLA<sub>2</sub>s hidrolisam um fosfolipídeo envolve o ataque nucleofílico de uma molécula de água na ligação *sn*-2 do substrato e depende da presença de um íon cálcio. Segundo modelo proposto por Verheij et al. (1980), o próton na posição 3 do anel imidazólico do resíduo de His<sup>48</sup> interage fortemente com o grupo carboxilato do Asp<sup>99</sup>, impedindo a rotação do anel imidazólico e mantendo-o na posição espacial apropriada (Figura 2).

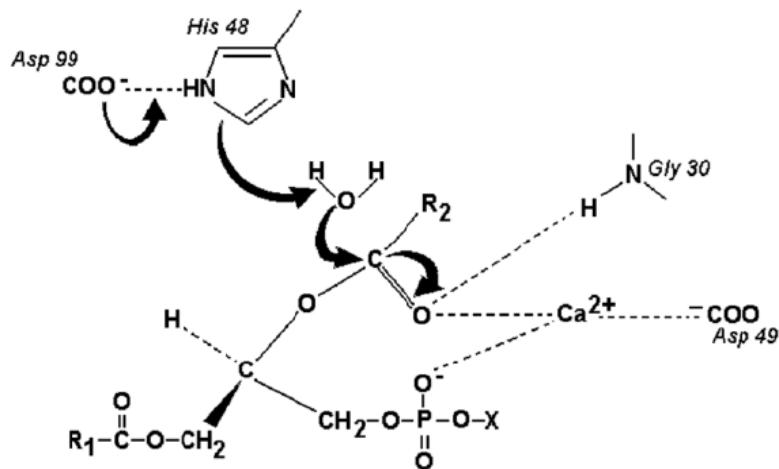


Figura 2 – Representação esquemática do mecanismo de catálise das PLA<sub>2</sub>s. Esse modelo foi proposto por Verheij et al. (1980) e mostra a interação do íon cálcio com o Asp<sup>49</sup> do sítio catalítico de sPLA<sub>2</sub>s e substrato. A molécula de água polarizada pelos resíduos His<sup>48</sup> e Asp<sup>99</sup> ataca o grupo carbonila do substrato (Fonte: Silveira, 2011).

O íon Ca<sup>2+</sup> é fundamental para a estabilização das moléculas envolvidas no processo catalítico, ao se manter coordenado à carboxila da cadeia lateral do Asp<sup>49</sup> e aos oxigênios carbonílicos dos resíduos de Tyr<sup>28</sup>, Gly<sup>30</sup> e Gly<sup>32</sup>, bem como a duas moléculas de água (Figura 3). O fosfolipídeo desloca uma das moléculas de água coordenadas pelo íon cálcio, formando o complexo enzima-substrato. Por meio de interações eletrostáticas, o Ca<sup>2+</sup> polariza a carbonila na posição *sn*-2 do substrato (Figura 3).

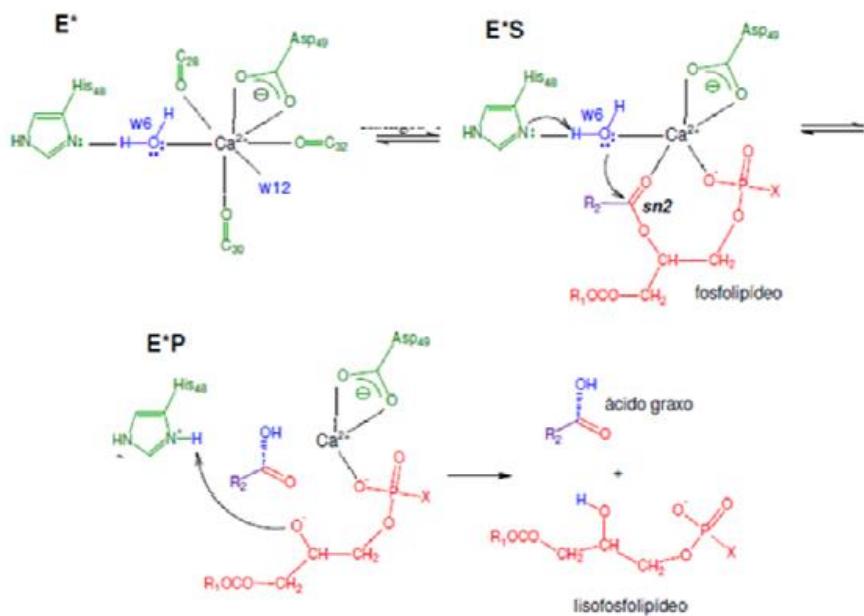


Figura 3 – Mecanismo catalítico de uma PLA<sub>2</sub>. Foi proposto por Kini (2003). Em verde estão os componentes enzimáticos e em vermelho o substrato. Os símbolos C<sub>28</sub>, C<sub>30</sub> e C<sub>32</sub> representam os carbonos alfa dos resíduos 28, 30 e 32, respectivamente. W<sub>6</sub> e W<sub>12</sub> (em azul) se referem a duas moléculas de água. R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são cadeias alifáticas quaisquer, sendo R<sub>2</sub> (em lilás) a cadeia alifática do grupo ligado à carbonila *sn*-2 do fosfolipídeo (Fonte: Gimenes, 2013).

Nesse estágio ocorre o ataque nucleofílico de uma molécula de água sobre o carbono do grupo éster do substrato fosfolipídico, transferindo um próton para o nitrogênio do anel imidazólico da His<sup>48</sup> e, assim, facilitando a reação. Logo após a hidrólise da ligação acil-éster na posição *sn*-2 do fosfolipídeo, o oxigênio que ficou livre recebe este próton doado pela His<sup>48</sup>, formando o grupo álcool do lisofosfolipídeo a ser liberado juntamente com o ácido graxo (Figura 6) (ARNI; WARD, 1996; KINI, 2003; VERHEIJ et al., 1980).

As sPLA<sub>2</sub>s podem ainda ser classificadas de acordo com o resíduo de aminoácido encontrado na posição 49. As que apresentam um resíduo de Aspartato são chamadas de Asp<sup>49</sup>, possuem resíduos conservados na região catalítica e na região de ligação do cálcio, e dependem de Ca<sup>2+</sup> para hidrolisarem fosfolipídeos de membranas celulares, liberando ácido araquidônico e induzindo a síntese de mediadores inflamatórios (DOLEY; ZHOU; KINI, 2009). Outras PLA<sub>2</sub>s possuem um resíduo de Lisina e são denominadas Lys<sup>49</sup> ou PLA<sub>2</sub>-símile, pois possuem baixa ou nenhuma atividade catalítica. No entanto, essas PLA<sub>2</sub>s Lys<sup>49</sup> também são biologicamente ativas e causam danos celulares e, por isso, têm sido objeto de estudos que visam entender a indução de mionecrose por um mecanismo de ação independente de catálise (DELATORRE et al., 2010; POLGÁR et al., 1996). Algumas PLA<sub>2</sub>s Lys<sup>49</sup> altamente miotóxicas foram isoladas das peçonhas de *B. asper* (MT-II), *B. jararacussu* (BthTX-I), *B. pirajai* (PrTX-I) e *B. moojeni* (MjTX-II) (SOARES; GIGLIO, 2003).

Alguns estudos estruturais comparativos demonstram que a substituição de Asp por Lys na posição 49 da cadeia polipeptídica altera seu funcionamento e pode levar à perda da atividade catalítica (SCOTT et al., 1990). Arni e Ward (1996) mostraram que o Asp<sup>49</sup> é essencial para a ligação do Ca<sup>2+</sup> e que a região receptora é modificada pela troca de aminoácidos nessa posição, impedindo a ligação correta do Ca<sup>2+</sup> às PLA<sub>2</sub>s. A substituição conservadora de Aspartato por Glutamato, por exemplo, resulta em uma diminuição de até doze vezes na afinidade com o cálcio.

Contudo, Magro et al. (2003) conduziram um estudo substituindo o resíduo Lys por Asp na posição 49 de PLA<sub>2</sub>s-símile e observaram que não houve alteração de seu estado cataliticamente inativo, sugerindo que a inatividade dessas enzimas também depende de outras modificações estruturais. A atividade miotóxica das PLA<sub>2</sub>s Lys<sup>49</sup>, por exemplo, pode estar relacionada à participação ativa de resíduos hidrofóbicos e catiônicos próximos à região C-terminal da molécula (CALDERÓN; LOMONTE, 1998; SANTOS et al., 2011). Outros estudos, realizados com peptídeos sintéticos variantes da Lys49, demonstram que provavelmente este sítio farmacológico é responsável pelos danos celulares causados por essas enzimas (CHIOATO et al., 2002; LOMONTE; ANGULO; SANTAMARIA, 2003;

WARD et al., 2002).

A atividade catalítica das PLA<sub>2</sub>s é responsável por seus efeitos sobre a pressão arterial e sobre as plaquetas, e também pela sua toxicidade (CHANG; SU, 1982; DÍAZ-OREIRO; GUTIÉRREZ, 1997). Contudo, alguns de seus efeitos farmacológicos não dependem da capacidade catalítica dessas enzimas (KINI; EVANS, 1997; PÁRAMO et al., 1998; SOARES et al., 2001), despertando o interesse em estudos capazes de estabelecer uma correlação entre as bases estruturais, a atividade catalítica e as funções biológicas das PLA<sub>2</sub>s (COSTA et al., 2008; MURAKAMI et al., 1997; RODRIGUES et al., 2004; RODRIGUES et al., 2007; SANTOS-FILHO et al., 2008).

Essas enzimas PLA<sub>2</sub>s também são alvos de diversas pesquisas que buscam uma aplicação farmacológica para as mesmas, tendo em vista seus efeitos catalíticos sobre membranas celulares e tecidos específicos e seu papel na toxicidade da peçonha ofídica (ALVARADO; GUTIÉRREZ, 1988; FULY et al., 1997; LLORET; MORENO, 1993; OWNBY, 1998; PÁRAMO et al., 1998; SOARES et al., 1998; YUAN et al., 1993).

As PLA<sub>2</sub>s encontradas em peçonhas de serpentes (*snake venom phospholipases A2 – svPLA<sub>2</sub>*) pertencem aos grupos I e II e possuem cerca de 119 a 143 resíduos de aminoácidos, diferindo quanto à estrutura primária e ao estado de agregação (DENEGRI et al., 2010). As serpentes das famílias Elapidae e Hydrophiidae, geralmente, apresentam enzimas do grupo I, enquanto as PLA<sub>2</sub>s das peçonhas de serpentes da família Viperidae são do grupo II (WARD et al., 2001).

As enzimas do grupo I, em geral, são secretadas como zimogênios e dependem de clivagem proteica para manifestarem sua atividade enzimática. Já as sPLA<sub>2</sub>s do grupo II possuem uma cauda adicional na região C-terminal capaz de formar uma ponte dissulfeto extra com um resíduo próximo ao sítio ativo (HENRIKSON; KRUEGER; KEIM, 1977; SETÚBAL et al. 2013). Além disso, as enzimas do grupo II compartilham características estruturais com as PLA<sub>2</sub>s presentes em exsudatos inflamatórios de mamíferos (BURKE; DENNIS, 2009) e participam dos principais efeitos tóxicos dos envenenamentos ofídicos (MURAKAMI; KUDO, 2002).

As PLA<sub>2</sub>s botrópicas estão envolvidas no metabolismo de lipídeos estruturais da membrana celular (ARNI; WARD, 1996; KINI, 2003), nas respostas inflamatórias induzidas por peçonhas, como edema, dor e migração de leucócitos (TEIXEIRA et al., 2003), e nos efeitos anticoagulante, hemolítico e necrosante (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003; HARRIS, 2003; MARUÑAK et al., 2007; OWNBY, 1998; VALENTÍN; LAMBEAU, 2000).

Muitas PLA<sub>2</sub>s isoladas das peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* já descritas são proteínas básicas que apresentam ou não atividades catalítica, miotóxica, edemato-gênica e anticoagulante (ABREU et al., 2007; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; OWNBY et al., 1999; PONCE-SOTO et al., 2006; SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004). As PLA<sub>2</sub>s básicas já foram isoladas das peçonhas de *B. asper* (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 1989; RUEDA et al., 2013), *B. jararacussu* (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000) e *B. brazili* (COSTA et al., 2008). Rodrigues et al. (1998) isolaram BnSP-7, uma PLA<sub>2</sub> Lys<sup>49</sup> não catalítica e miotóxica, da peçonha de *B. (neuwiedi) pauloensis*, que apresentou efeito bactericida e foi capaz de bloquear a contração neuromuscular (SOARES et al., 2000).

Por outro lado, as PLA<sub>2</sub>s ácidas encontradas em peçonhas botrópicas em geral não apresentam efeitos tóxicos diretos sobre os tecidos, embora sejam capazes de induzir efeitos farmacológicos importantes como inibição da agregação plaquetária e hipotensão arterial (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; DENEGRI et al., 2010; SERRANO et al., 1999).

Dentre as svPLA<sub>2</sub>s ácidas, temos a *Bl*-PLA<sub>2</sub> isolada da peçonha de *B. leucurus*, uma Asp<sup>49</sup> capaz de induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12p40, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, por células mononucleares humanas (NUNES et al., 2011). Ferreira et al. (2013) purificaram BpPLA<sub>2</sub>-TXI da peçonha de *B. pauloensis*, uma PLA<sub>2</sub> ácida miotóxica que causou edema *in vivo* e inibiu a agregação plaquetária induzida por colágeno ou ADP *in vitro*. Outros exemplos de PLA<sub>2</sub> foram isoladas da peçonha de *B. moojeni*, como a BmooTX-I, miotóxica e capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno ou ADP (SANTOS-FILHO et al., 2008) e BmooPLA<sub>2</sub>, uma PLA<sub>2</sub> não miotóxica, com efeito hipotensivo e bactericida, que apresentou citotoxicidade moderada *in vitro* e foi capaz de induzir edema *in vivo* (SILVEIRA et al., 2013).

Dentre as PLA<sub>2</sub>s purificadas a partir da peçonha de *B. alternatus* está a BaTX, descrita por Ponce-Soto et al. (2007) como uma PLA<sub>2</sub> Lys<sup>49</sup> básica de aproximadamente 14 kDa que demonstrou neurotoxicidade ao bloquear as transmissões neuromusculares em preparações do tipo *biventer cervicis*, citotoxicidade sobre mioblastos *in vitro*, miotoxicidade e indução de edema em camundongos (PONCE-SOTO et al., 2009). Denegri et al. (2010) também isolaram da peçonha de *B. alternatus* uma PLA<sub>2</sub> Asp<sup>49</sup> ácida, designada Ba SpII RP4, capaz de atrasar o tempo de coagulação *in vitro* e de induzir edema em camundongos, embora não tenha demonstrado miotoxicidade quando injetada intramuscularmente.

Mais recentemente, Setúbal et al. (2013) isolaram da peçonha de *B. alternatus* BaltTX-I, uma PLA<sub>2</sub> Lys<sup>49</sup> cataliticamente inativa, e BaltTX-II, uma PLA<sub>2</sub> Asp<sup>49</sup>, e avaliaram seus efeitos *in vitro* sobre macrófagos induzidos com tioglicolato. Embora ambas tenham

levado ao aumento da creatina quinase plasmática, BaltTX-I estimulou a fagocitose mediada por receptores do sistema complemento, enquanto BaltTX-II apresentou atividade enzimática mais significativa. Em concentrações não citotóxicas, essas PLA<sub>2</sub>s são capazes de estimular as funções dos macrófagos e induzir a produção de superóxido por essas células (SETÚBAL et al., 2013).

Embora existam muitos estudos descrevendo novas svPLA<sub>2</sub>s, estas enzimas continuam despertando interesse devido à necessidade de melhor entendermos a correlação entre sua estrutura, propriedades catalíticas e efeitos tóxicos, além de buscarmos possíveis aplicações terapêuticas para as mesmas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Caracterizar estrutural e funcionalmente uma fosfolipase A<sub>2</sub> isolada da peçonha de *B. alternatus*.

#### 3.2 Específicos

- Isolar e caracterizar bioquimicamente uma fosfolipase A<sub>2</sub> da peçonha de *B. alternatus*.
- Caracterizar estruturalmente a fosfolipase A<sub>2</sub> isolada por meio da determinação da sua massa molecular e ponto isoelétrico.
- Caracterizar os principais efeitos enzimáticos da fosfolipase A<sub>2</sub> isolada.
- Avaliar a atividade edematógena e hiperalgésica da toxina isolada.
- Determinar a ação citotóxica da toxina isolada sobre células tumorais.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Peçonha de *Bothrops alternatus***

A peçonha bruta da serpente *B. alternatus* foi obtida a partir de espécimes mantidas no Serpentário Bioagents, estabelecido na Fazenda Boa Esperança s/n – Zona Rural – Batatais/SP. Após a extração, a peçonha foi liofilizada e armazenada a -20°C até o momento do uso.

### **4.2 Animais experimentais**

Os camundongos machos da linhagem Swiss (20 – 25 g) e os ratos machos Wistar (200 – 250 g) foram fornecidos pela Universidade Federal de Uberlândia e mantidos no Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas em condições de luminosidade, temperatura e umidade controladas, com livre acesso à água e à comida.

Todos os experimentos seguiram as normas éticas de experimentação animal, conforme especificado pela Comissão de Ética na Utilização Animal da Universidade Federal de Uberlândia no protocolo de registro 108/12.

### **4.3 Obtenção do sangue humano**

O sangue humano foi obtido em conformidade com as diretrizes atuais para investigações com seres humanos, estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (protocolo de registro nº 055/11).

### **4.4 Purificação da fosfolipase A<sub>2</sub>**

As etapas de purificação da toxina foram realizadas por meio de três passos, envolvendo cromatografias de troca iônica, exclusão molecular e interações hidrofóbicas em sistema aberto segundo técnicas descritas por Oliveira (2001) com algumas modificações.

Cerca de 400 mg da peçonha bruta foram dissolvidos em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M (pH 7,8) e centrifugados a 10000 xg por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante preparado foi submetido a uma coluna de troca iônica DEAE Sephadex (90

mL – 1,5 x 15 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. As amostras foram eluídas num gradiente contínuo de concentração crescente de bicarbonato de amônio (0,05 M a 0,8 M) pH 7,8, utilizando uma câmara de mistura com um volume de 150 mL. Frações de 3 mL/tubo foram coletadas sob um fluxo de 20 mL/hora por um coletor de frações Bio Rad (modelo 2110). As absorbâncias das frações foram medidas no espectrofotômetro BioSpec-Mini (Shimadzu Biotech) em um comprimento de onda de 280 nm. Após a análise das absorbâncias construiu-se um perfil cromatográfico e as amostras foram reunidas em *pools* e liofilizadas.

A fração de interesse foi submetida à coluna cromatográfica contendo resina de exclusão molecular Sephadex G75 (200 mL – 1,0 x 100 cm), equilibrada e eluída com bicarbonato de amônio 0,05 M (pH 7,8). Frações de 3 mL/tubo foram coletadas sob um fluxo de 20 mL/hora por um coletor Bio Rad. Novamente as frações tiveram sua absorbância lida no espectrofotômetro BioSpec-Mini em um comprimento de onda de 280 nm e foram reunidas em *pools* e liofilizadas.

Uma única fração resultante desse segundo passo cromatográfico foi submetida ao terceiro e último procedimento de purificação em resina Phenyl Sepharose (20 mL – 1,5 x 2,5 cm). A resina foi equilibrada com tampão Tris-NaCl 4,0 M (pH 8,5) e eluída com gradiente contínuo de concentração decrescente do mesmo tampão, utilizando Tris-HCl 0,01 M (pH 8,5) e uma câmara de mistura com volume de 60 mL para diluição. A cromatografia foi finalizada após eluição com água ultrapura. Frações de 3 mL/tubo foram coletadas sob um fluxo de 20 mL/hora pelo coletor Bio Rad e suas absorbâncias a 280 nm foram monitoradas por meio de leituras no espectrofotômetro BioSpec-Mini.

#### **4.5 Determinação quantitativa da proteína**

Para determinação quantitativa das proteínas presentes nas amostras utilizou-se o método Ultravioleta, conforme descrito por Layne (1957). De acordo com esta técnica, alíquotas de 1 mL das frações delimitadas a partir do perfil cromatográfico foram dosadas pelo software do espectrofotômetro BioSpec-Mini (Shimadzu Biotech). A absorbância de uma solução de proteínas a 280 nm é diretamente proporcional ao seu conteúdo proteico, devido à capacidade de absorção de luz ultravioleta pelos aminoácidos aromáticos. A concentração das proteínas presentes foi determinada a partir da leitura das amostras a um comprimento de onda de 280 nm e sua comparação com um branco sem proteínas. O equipamento fornece a dosagem de proteínas em mg/mL.

#### **4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes**

O monitoramento dos diversos passos de purificação foi realizado por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 14%, realizada conforme a técnica descrita por Laemmli (1970).

Utilizou-se um gel de empilhamento a 5% em pH 6,8 contendo 0,125 M de Tris-HCl e 0,1% de SDS e um gel de separação a 14% em pH 8,8 e 0,1% de SDS, mantendo a relação acrilamida: bis-acrilamida de 30:0,8 (m/m). As amostras foram dissolvidas em tampão contendo Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8); 10% (v/v) de glicerol; 0,2% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol como corante e aquecidas à 100°C durante 3 a 5 minutos. Esse procedimento associado à presença do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol promove a clivagem das pontes dissulfeto e desnaturação de proteínas, mostrando no gel a presença ou não de subunidades proteicas.

Após a corrida a 25 mA constante, o gel foi imerso por 15 minutos em corante contendo uma mistura de Coomassie Blue R-250 a 0,2% (m/v) dissolvido em água: metanol: ácido acético (4:5:1 v/v) e, em seguida, descorado em água: etanol: ácido acético (6:3:1 v/v), sendo que apenas as bandas proteicas permaneceram coradas.

Para estimativa da massa molecular também foi adicionado ao gel 2  $\mu$ L do padrão de massa molecular Low Molecular Weight (GE Healthcare Life Science), contendo as seguintes proteínas: fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa).

#### **4.7 Eletroforese bidimensional**

A técnica de eletroforese bidimensional foi empregada para determinação do ponto isoelétrico (pI) da proteína, estimativa da massa molecular e do grau de pureza. A amostra foi solubilizada em solução de rehidratação contendo uréia 7,0 M, tioureia 2,0 M, CHAPS 2,0 % (m/v), *immobilized pH gradient buffer (IPG buffer®)* 0,5% (v/v) e azul de bromofenol 1,0 % (m/v); e aplicada sobre tiras de poliacrilamida de 7 cm com gradiente de pH de 3,0 a 10,0 imobilizado de forma linear (*ImmobilineDryStrip®*).

A focalização isoelétrica foi realizada no *IPGphor III System* (GE Healthcare Life Science) de acordo com as instruções do fabricante. Após a focalização isoelétrica, a amostra foi reduzida e alquilada e a tira posicionada na porção superior de gel de SDS-PAGE 15% (m/v) para realização da segunda dimensão (15 mA, 90 minutos). O gel foi corado e

descorado conforme descrito anteriormente. A imagem do gel foi obtida com auxílio de um *Image Scanner III*® e analisada com auxílio do software *IQTL* (GE Healthcare Life Science).

#### **4.8 Espectrometria de massas**

A massa molecular da proteína isolada foi determinada por meio da técnica de espectrometria de massas. A espectrometria foi realizada em equipamento de MALDI (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*), com dois analisadores TOF (*Time of flight*) (modelo AXIMA-TOF<sup>TM</sup> – Shimadzu Biotech), operando em modo linear e utilizando solução saturada de ácido sinapínico como matriz de ionização. A massa molecular da amostra foi determinada por comparação com padrões externos de proteínas.

Os experimentos descritos nos itens 4.7 e 4.8 foram realizados no Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde – FIOCRUZ (Porto Velho – RO), em colaboração com o pesquisador Doutor Andreimar Martins Soares.

#### **4.9 Atividade hemolítica indireta**

A capacidade da proteína isolada de hidrolisar fosfolipídeos foi avaliada pelo método da hemólise radial indireta em placas, como descrito por Gutiérrez et al. (1988). A atividade foi realizada em um gel de agarose a 1%, suplementado com gema de ovo e eritrócitos humanos lavados com PBS (*phosphate buffered saline* – pH 7,2). Diferentes quantidades da amostra (5, 10, 20 e 40 µg) foram diluídas em 50 µL de PBS e aplicadas em orifícios de tamanho uniforme feitos no gel. Após aplicação das amostras, o gel foi incubado por intervalos de 24 e 48 horas a 37°C para avaliação da atividade.

A formação de um halo hemolítico translúcido ao redor do orifício indica que as amostras são capazes de hidrolisar fosfolipídeos, sendo que a medição da área do halo formado é utilizada para quantificação da atividade fosfolipásica.

#### **4.10 Atividade miotóxica**

A miotoxicidade da proteína isolada foi avaliada a partir da sua capacidade de induzir alterações morfológicas nas fibras musculares de camundongos (MAMEDE, 2011). Os camundongos (n = 3) receberam injeção intramuscular de 50 µg da amostra no músculo gastrocnêmio da pata direita, e injeção intramuscular de 50 µL de salina estéril no mesmo

músculo da pata contralateral, como controle negativo.

Após um intervalo de 24 horas, os animais foram sacrificados com overdose de tiopental e os músculos gastrocnêmios foram dissecados e embebidos em solução fixadora de formol a 10% durante 24 horas. Os músculos foram processados em soluções de etanol de concentração crescente (70, 85, 95% e absoluto) e xilol absoluto para serem incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em secções de 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina para análise das fibras musculares em microscopia óptica.

#### **4.11 Atividade edematogênica e hiperalgésica**

O efeito inflamatório da proteína isolada foi avaliado com base em suas ações edematogênica e nociceptiva induzidas na pata de ratos. Os animais ( $n = 3$ ) receberam injeção de 50 µg da amostra na região intraplantar da pata posterior direita, e injeção intraplantar de 100 µL de salina estéril na pata contralateral, como controle negativo.

Para avaliação da formação de edema, o volume (mL) de ambas as patas posteriores (até a articulação tibio-társica) foi mensurado com o auxílio do aparelho pletismômetro (modelo 7140, Ugo Basile). As medições foram feitas antes e 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas após a injeção da amostra, de acordo com a técnica descrita por Van Arman et al. (1965). Concomitantemente, para avaliar o aumento da sensibilidade nociceptiva (hiperalgesia) dos animais, foi utilizado o teste de pressão da pata, usando o aparelho analgesímetro (Ugo Basile) conforme descrito por Randall e Selitto (1957). Neste teste, uma força em gramas (g) crescente (16 g/s) é continuamente aplicada sobre a superfície plantar de uma das patas posteriores do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de “retirada” do membro. O limiar de dor, neste modelo, é representado como a força (g) necessária para a indução desta reação. Os resultados de ambos os testes foram calculados a partir da diferença entre as medidas de ambas as patas e expressos em porcentagem de aumento do volume e diminuição do limiar nociceptivo da pata, em relação às medidas iniciais.

#### **4.12 Ensaio sobre agregação plaquetária**

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado como descrito por Sanchez et al. (2010), com algumas modificações. O sangue humano coletado na presença de citrato de sódio foi centrifugado a 100 xg durante 12 minutos a temperatura ambiente para obtenção do PRP. O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido nas mesmas condições, porém com

centrifugação a 1000 xg por 15 minutos.

A agregação plaquetária foi avaliada durante 10 minutos por ensaios turbidimétricos utilizando o Agregômetro automático de 4 canais (AggRAM™ versão 1.1, Helena Laboratories). Os ensaios de inibição da agregação foram realizados a 37°C em cubeta de vidro siliconizada, usando 200 µL de PRP, mantidos sob agitação constante. A proteína isolada foi adicionada ao PRP e, em seguida, foram adicionados os seguintes agonistas plaquetários: ADP (20 µM), colágeno (10 µg/mL), ristocetina (1,5 mg/mL) e epinefrina (300 µM). A contagem do tempo foi iniciada com a adição dos agonistas, após diferentes tempos de pré-incubação (0, 5 e 15 minutos) do PRP com concentrações variadas (1, 5, 10 e 20 µg) da toxina isolada. Experimentos controle positivo foram realizados usando apenas agonistas plaquetários e os ensaios foram realizados em triplicatas.

As curvas resultantes dos ensaios foram expressas em porcentagem de agregação calculada pela diferença de absorbância do PRP testado em relação ao PPP, que representa 100% de agregação.

#### **4.13 Ensaio de citotoxicidade sobre células tumorais**

##### **4.13.1 Cultura de células HeLa**

Células derivadas do carcinoma de colo uterino humano (linhagem HeLa) foram mantidas em cultura no Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal de Uberlândia. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com HEPES (25 mM), penicilina G (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), L-glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (3 mM) e soro fetal bovino a 10% (RPMI completo) em atmosfera úmida de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

##### **4.13.2 Tratamento das células**

As células HeLa foram adicionadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de 2 x 10<sup>4</sup> células/poço/200µL e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após lavagem com meio RPMI, diferentes concentrações da amostra (2,5 µg – 20 µg) foram adicionadas e incubadas por 24 horas nas mesmas condições. O grupo controle (células não tratadas) recebeu somente meio RPMI completo. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

#### 4.13.3 Análise de MTT

A viabilidade celular foi determinada, diretamente, pela análise de MTT. A função mitocondrial de células HeLa tratadas com a toxina isolada e das células do grupo controle foi avaliada utilizando-se o método de conversão do azul de tiazolil (MTT), como descrito por Mosmann (1983). Em resumo, as células foram lavadas com meio RPMI e adicionadas de 0,5 mg/mL de MTT em meio RPMI completo, em triplicata. Após 4 horas de intervalo, o sobrenadante foi removido e as partículas insolúveis de coloração roxa produzidas pelas células viáveis, que metabolizaram o MTT, foram, então, solubilizadas com 10% de duodecil sulfato de sódio (SDS) e 50% N, N-dimetil formamida. Após 30 minutos de incubação sob agitação, a densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor de placas Titertek Multiskan Plus (Flow Laboratories).

#### 4.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism, versão 5.01. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento e caracterização bioquímica da fosfolipase A<sub>2</sub>

O fracionamento inicial de 400 mg da peçonha bruta de *B. alternatus* foi realizado em resina de troca iônica DEAE Sephadex. As amostras foram eluídas com um gradiente contínuo de concentração crescente de bicarbonato de amônio: 0,05 M, 0,15 M, 0,3 M, 0,6 M e 0,8 M (pH 7,8), utilizando uma câmara de mistura com volume final de 125 mL. O perfil cromatográfico é mostrado na Figura 4.

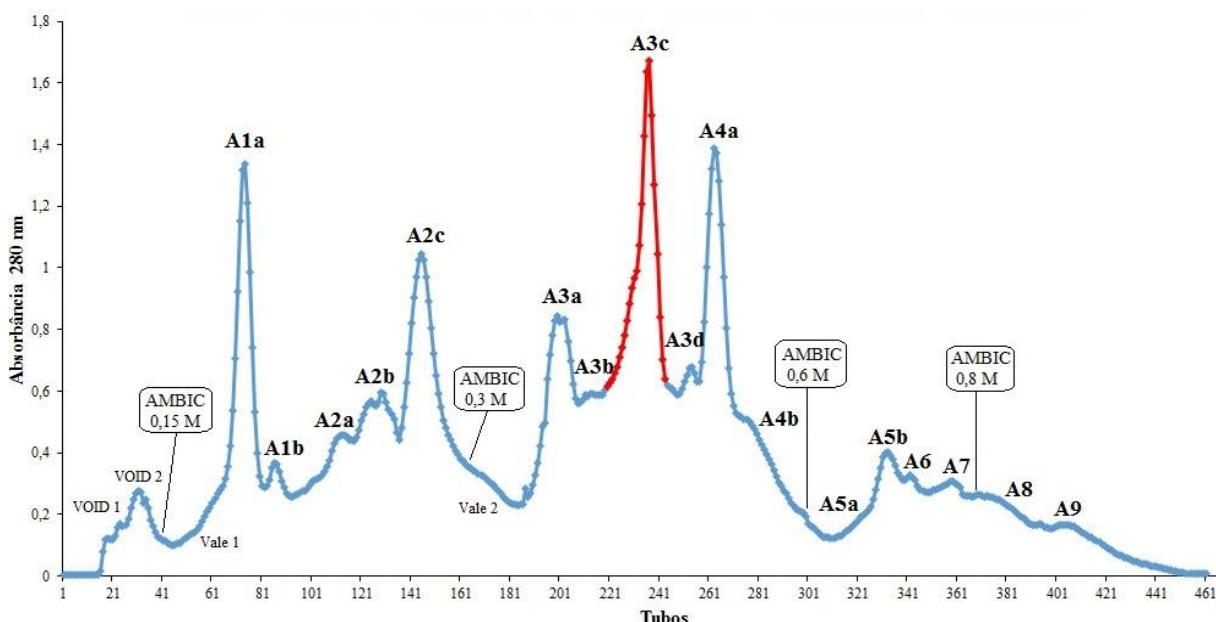


Figura 4 – Fracionamento da peçonha bruta de *B. alternatus* em DEAE Sephadex. Cerca de 400 mg da peçonha foram submetidos à coluna de troca iônica, previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M (pH 7,8). As amostras foram eluídas com um gradiente contínuo de concentração crescente (0,05 M a 0,8 M) do mesmo tampão sob fluxo de 20 mL/hora. Trocas de tampão: tubo 01: 0,05 M; 41: 0,15 M; 161: 0,3 M; 300: 0,6 M; 364: 0,8 M. Em vermelho destacamos a fração de interesse que foi submetida ao passo de purificação seguinte.

A DEAE Sephadex é uma resina de troca iônica, isto é, separa as proteínas de acordo com a diferença de carga entre elas. Por ser uma resina aniônica, sua carga positiva atrai ânions e retém as proteínas ricas nesse tipo de íon, enquanto as moléculas de carga positiva ou neutra saem livremente, constituindo o void cromatográfico. Por outro lado, as proteínas de carga negativa interagem com a resina e ficam retidas na coluna, até serem eluídas pelo tampão salino de concentração crescente, capaz de alterar as condições de adsorção da coluna. Assim, o aumento da concentração de tampão bicarbonato de amônio altera as forças iônicas, neutralizando as interações entre as moléculas da amostra e da resina, e as proteínas são

eluídas gradualmente, conforme a força dessas interações. Quanto mais negativa for a carga de uma amostra, maior é a força da sua interação com a resina e, portanto, maior será a concentração de sal necessária para sua remoção da coluna.

O perfil cromatográfico apresentou 9 frações principais, designadas de A1 a A9, e as subfrações, como indicado na Figura 4. Todas as frações foram analisadas por SDS-PAGE a 14%, em condições redutoras, para avaliar o perfil dessa etapa de purificação e testadas quanto à atividade hemolítica indireta em placa (resultados não mostrados). Nessa atividade, a presença de fosfolipases A<sub>2</sub> nas amostras é indicada pela formação de um halo hemolítico translúcido. Essas enzimas hidrolisam os fosfolipídeos pertencentes à gema de ovo e, assim, promovem a liberação de ácidos graxos. Os ácidos graxos, por sua vez, causam a redução do pH, desestabilizando a membrana dos eritrócitos e causando sua lise, visualizada no gel.

O perfil eletroforético das subfrações A3 (picos A3a, A3b, A3c e A3d), provenientes da DEAE Sephadex está apresentado na Figura 5.

A fração A3c foi escolhida para os experimentos seguintes devido à sua capacidade de hidrolisar fosfolipídeos, demonstrada com a indução do maior halo hemolítico dentre os picos da DEAE (dados não mostrados). No entanto, a análise de seu perfil eletroforético (linhas 6 e 7 da Figura 5) indicou a presença de muitas bandas proteicas, tornando necessários outros passos de purificação a fim de obter uma amostra mais pura.

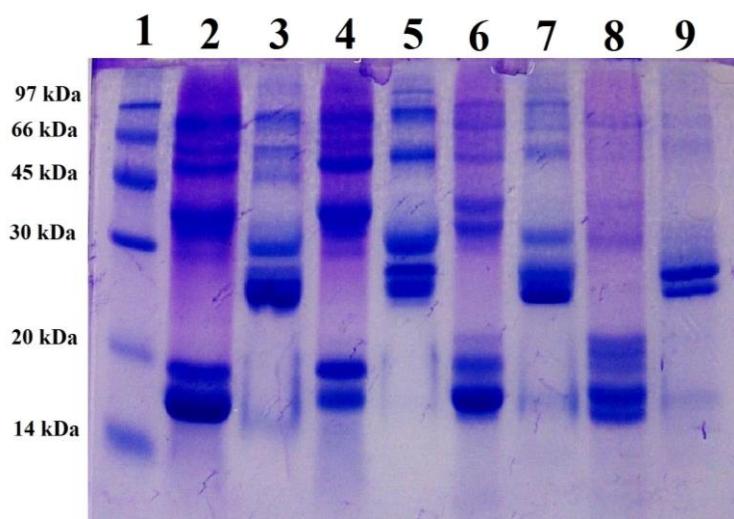


Figura 5 – Perfil em SDS-PAGE (14%) das subfrações A3 provenientes da DEAE Sephadex. Os picos são mostrados em condições redutoras (com  $\beta$  mercaptoetanol) e não redutoras (sem  $\beta$  mercaptoetanol). A migração das amostras foi comparada ao padrão de massa molecular: fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa). Linha 1: padrão de massa molecular. Linha 2: Pico A3a reduzido. Linha 3: Pico A3a não reduzido. Linha 4: Pico A3b reduzido. Linha 5: Pico A3b não reduzido. Linha 6: Pico A3c reduzido. Linha 7: Pico A3c não reduzido. Linha 8: Pico A3d reduzido. Linha 9: Pico A3d não reduzido.

Após dosagem pelo método de ultravioleta, aproximadamente 90 mg do pico A3c foram submetidos ao passo cromatográfico subsequente em coluna contendo resina de exclusão molecular Sephadex G75, que foi equilibrada e eluída com bicarbonato de amônio 0,05 M (pH 7,8). O perfil cromatográfico está mostrado na Figura 6.

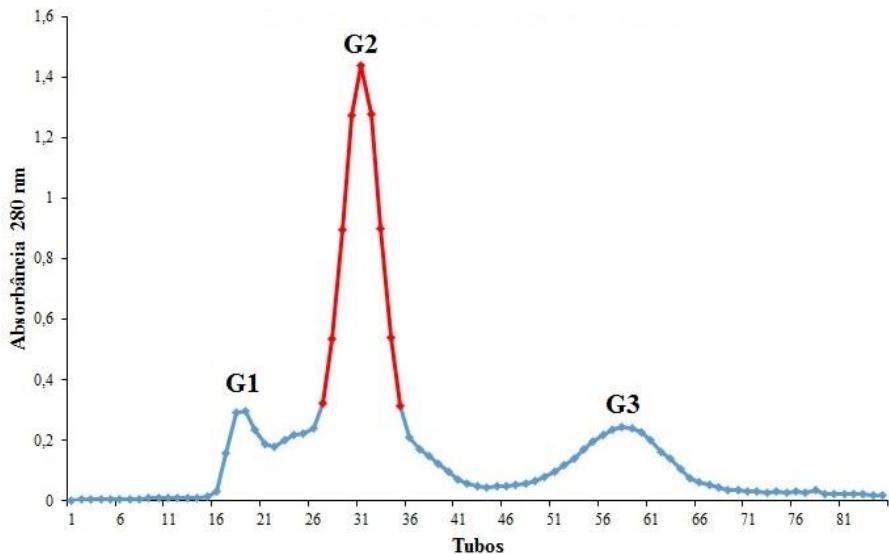


Figura 6 – Cromatografia do pico A3c em resina Sephadex G75. Cerca de 90 mg da subfração A3c foram submetidos à coluna de exclusão molecular, previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M (pH 7,8). As amostras foram eluídas com o mesmo tampão sob fluxo de 20 mL/hora. Em vermelho destacamos a fração de interesse que foi submetida ao passo de purificação seguinte.

A Sephadex G75 é uma resina de exclusão molecular que separa as proteínas conforme seu tamanho ou massa molecular. Essa resina apresenta grãos de porosidade controlada e à medida que as proteínas percorrem os canais internos e externos dos grãos, elas são eluídas separadamente. Assim, as moléculas maiores são eluídas primeiro, uma vez que não ficam retidas nos poros e percorrem livremente a extensão da coluna. Por outro lado, as proteínas menores penetram em um maior número de poros durante seu percurso e, por isso, necessitam de mais tempo para sua eluição. Portanto, nesse tipo de resina a ordem de eluição é sempre da molécula mais pesada (excluída) para a molécula mais leve (permeada).

O perfil cromatográfico da Sephadex G75 do pico A3c apresentou três frações designadas G1, G2 e G3, como indicado na Figura 6. Todas as frações foram testadas quanto à atividade hemolítica indireta, sendo que o pico G2 apresentou melhor resultado, induzindo um halo hemolítico de 100 mm<sup>2</sup> (com 24 horas de incubação) e de 306 mm<sup>2</sup> (com 48 horas) com a dose de 40 µg (número 3 da Figura 10A). Além disso, a análise em SDS-PAGE a 14% (Figura 7) mostra que G2, em condições redutoras, apresenta uma banda majoritária de aproximadamente 17 kDa. No entanto, a presença de outras bandas menos evidentes indica a necessidade de mais um passo cromatográfico para aprimoramento da purificação.

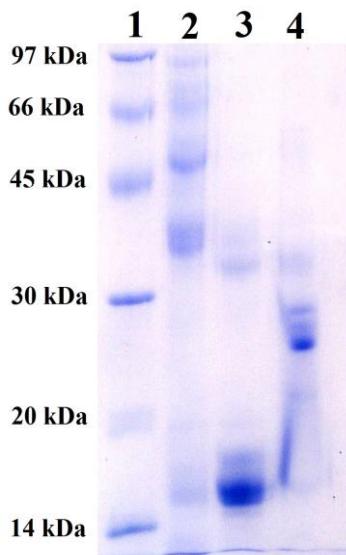


Figura 7 – Perfil em SDS-PAGE (14%) das frações provenientes da cromatografia em Sephadex G75. A migração das amostras foi comparada ao padrão de massa molecular: fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa). Linha 1: padrão de massa molecular. Linha 2: G1 reduzido. Linha 3: G2 reduzido. Linha 4: G2 não reduzido. O pico G3 não foi visualizado no gel devido ao seu baixo peso molecular.

No terceiro e último passo de purificação, 42 mg do pico G2 foram submetidos à Phenyl Sepharose, uma resina de interação hidrofóbica cujo objetivo é separar moléculas utilizando um gradiente decrescente de concentração de sal. Esse tipo de cromatografia explora a interação entre aminoácidos apolares de uma proteína e uma matriz de caráter hidrofóbico. Em solução salina concentrada, as proteínas perdem parte de sua camada de solvatação para os sais e, assim, expõem na sua superfície as regiões ricas em aminoácidos apolares. A interação com a matriz hidrofóbica aumenta na presença de alta concentração de íons e depende desses aminoácidos apolares. Dessa forma, as proteínas hidrofílicas, que possuem menos partículas apolares, pouco interagem com a resina e são eluídas primeiro. Por outro lado, as proteínas menos hidrofílicas ficam fortemente adsorvidas à coluna e apenas são eluídas com a diminuição da concentração de sal no tampão ou mesmo em condições livres de sal.

A proteína obtida na última fração da Phenyl Sepharose do pico G2 (Figura 8A) apresentou ótimo grau de pureza, intensa atividade fosfolipásica através da hemólise radial indireta (Figura 10A) e massa molecular de aproximadamente 19 kDa em condições redutoras e 17 kDa em condições não redutoras (Figura 8B). Essa fosfolipase A<sub>2</sub> foi, então, denominada BaG2P5.

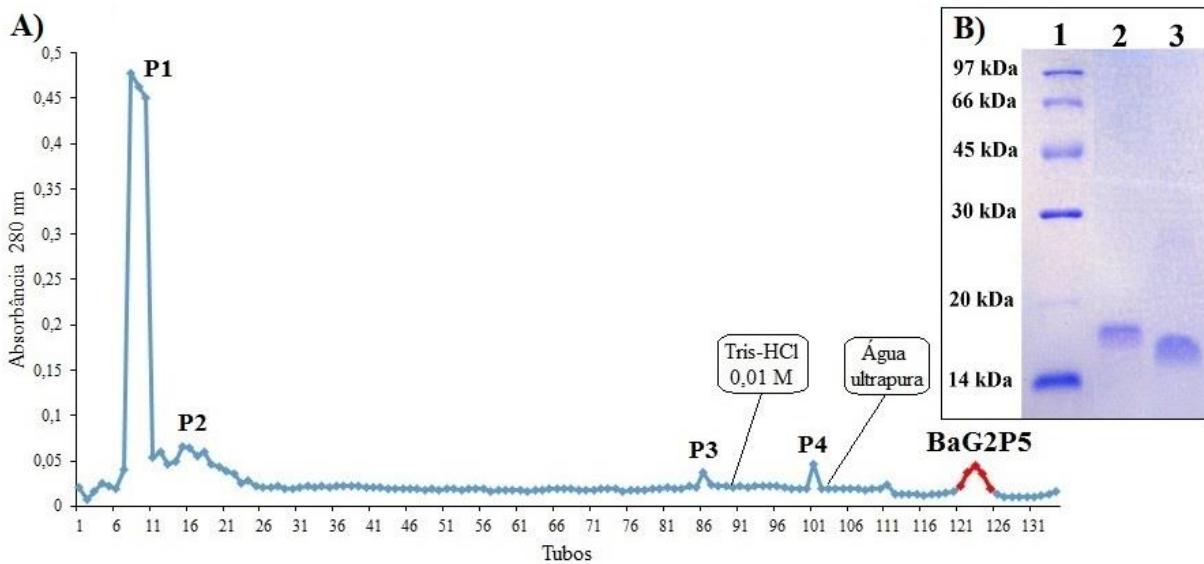


Figura 8 – Purificação da fosfolipase A<sub>2</sub> BaG2P5. (A) Cromatografia Phenyl Sepharose do pico G2. Cerca de 42 mg da fração foram submetidos à coluna de interação hidrofóbica previamente equilibrada com tampão Tris-NaCl 4,0 M (pH 8,5). As amostras foram eluídas com gradiente contínuo de concentração decrescente do mesmo tampão, sob fluxo de 20 mL/hora. Trocas de tampão: tubo 01: Tris-NaCl; 90: Tris-HCl; 102: água ultrapura. Em vermelho destacamos a fração de interesse que foi caracterizada e empregada nos ensaios subsequentes. (B) Perfil em SDS-PAGE (14%) da BaG2P5. A migração das amostras foi comparada ao padrão de massa molecular: fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa). Linha 1: padrão de massa molecular. Linha 2: BaG2P5 reduzida. Linha 3: BaG2P5 não reduzida.

A combinação das cromatografias de troca iônica, exclusão molecular e interação hidrofóbica já havia se mostrado um método eficiente para obtenção de uma svPLA<sub>2</sub>, quando Santos-Filho et al. (2008) isolaram BmooTX-I da peçonha de *B. moojeni*.

Em geral, os processos de purificação de proteínas exigem a realização de uma cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa para confirmação da pureza da amostra e eliminação de possíveis contaminantes. Outras PLA<sub>2</sub>s da peçonha de *B. alternatus* foram isoladas utilizando diferentes passos de purificação combinados, como, por exemplo, exclusão molecular seguida de fase reversa (DENEGRI et al., 2010; PONCE-SOTO et al., 2007) e a combinação de troca iônica, interação hidrofóbica e fase reversa (SETÚBAL et al., 2013). Vale ressaltar que a BaG2P5 foi isolada sem a necessidade da utilização de cromatografia de fase reversa.

O rendimento das três etapas de purificação foi calculado pelo percentual de recuperação dos picos principais em relação à peçonha bruta e está demonstrado na Tabela 1. Ao final do processo de purificação, foi recuperada uma massa de aproximadamente 2 mg de BaG2P5, o que implica em um rendimento de 0,5 % para o processo por inteiro. Nas demais etapas, o rendimento foi de 24% e 10,5% para as frações A3c e G2 respectivamente. As

perdas de amostras são inerentes ao processo de purificação, pois a cada etapa algumas moléculas podem ficar retidas nas resinas e nos recipientes utilizados durante os experimentos ou para seu armazenamento.

Peçonha Bruta	A3c	G2	BaG2P5
<b>400 mg</b>	90 mg	42 mg	2 mg
<b>100%</b>	24%	10,5%	0,5%

Tabela 1 – Rendimento do processo de purificação da BaG2P5. A porcentagem expressa a massa do pico ou proteína em relação à massa de peçonha bruta de *B. alternatus* empregada no primeiro passo cromatográfico.

Depois de isolada, BaG2P5 foi submetida à análise em eletroforese bidimensional e espectrometria de massas para determinação do ponto isoelétrico (pI), massa molecular e o grau de pureza. Os resultados são mostrados na Figura 9.

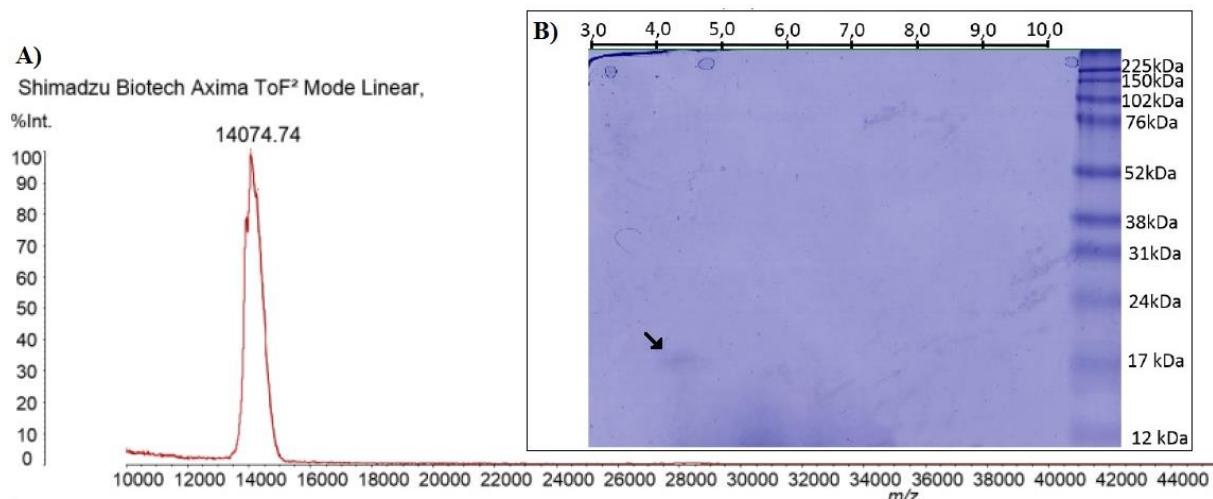


Figura 9 – Determinação da massa molecular e do ponto isoelétrico da BaG2P5. (A) Espectro de massa em AXIMA TOF<sup>2</sup>. A massa molecular observada foi de 14074,74 Da. O espectro representa a média dos pulsos a laser. (B) Eletroforese bidimensional, demonstrando um pI de 4,4 e massa aparente em torno de 17 kDa.

A massa molecular da BaG2P5 foi determinada pela técnica de espectrometria de massa, utilizando espectrômetro com analisador tipo MALDI. Como matriz ionizante, utilizou-se uma solução saturada de ácido sinapínico e esta foi homogeneizada com a amostra em uma proporção de 3:1 (v/v) e após a co-cristalização na placa do aparelho, esta foi introduzida na câmara a vácuo do AXIMA-TOF e analisada em modo linear. O espectro demonstra que a razão massa/carga ( $m/z$ ) da proteína é de 14074,74 Da ( $m/z$ ). O pI da

proteína, determinado pela eletroforese bidimensional, foi igual a 4,4, o que classifica BaG2P5 como uma fosfolipase A<sub>2</sub> ácida.

A massa molecular de BaG2P5 é semelhante à de outras PLA<sub>2</sub>s encontradas na peçonha de *B. alternatus*. Entretanto, pI pode variar muito conforme a composição de aminoácidos da proteína. A PLA<sub>2</sub> básica BaTX, purificada por Ponce-Soto et al. (2007), também apresentou massa molecular de aproximadamente 14 kDa, porém seu pI é igual a 8,63 devido à presença de muitos resíduos básicos e hidrofóbicos. Por outro lado, outra PLA<sub>2</sub> de *B. alternatus*, Ba SpII RP4 (DENEGRI et al., 2010) mostrou ser um homodímero, cujos monômeros têm aproximadamente 14 kDa de massa, com pI de 4,88, o que evidencia a presença de mais resíduos ácidos em sua composição.

## 5.2 Atividade hemolítica indireta

A atividade fosfolipásica de BaG2P5 foi testada pelo método de hemólise radial indireta. Como mencionado anteriormente, a formação de um halo hemolítico translúcido indica a presença de PLA<sub>2</sub>s capazes de hidrolisar fosfolipídeos e, assim, liberar ácidos graxos, causando redução do pH e consequente lise dos eritrócitos. A Figura 10 mostra os halos formados quando diferentes doses de BaG2P5 foram incubadas no gel por intervalos de tempo diferentes.

BaG2P5 demonstrou ter uma forte capacidade de hidrolisar fosfolipídeos, sendo seis vezes mais potente que a peçonha bruta de *B. alternatus* (Figura 10). Em 24 horas, apenas 5 µg de BaG2P5 foi capaz de formar um halo hemolítico de 161 mm<sup>2</sup>, cerca de 41% maior do que o halo de 114 mm<sup>2</sup> formado por 30 µg de peçonha bruta (Tabela 2).

A atividade fosfolipásica de BaG2P5 mostrou ser dependente da dose e do tempo de reação. Assim, quanto maior a dose da PLA<sub>2</sub> aplicada no gel, maior foi a área do halo hemolítico formado. No entanto, para o efeito dose-dependente esse aumento não foi proporcional.

	<b>30 µg de PB</b>	<b>5 µg de BaG2P5</b>	<b>10 µg de BaG2P5</b>	<b>20 µg de BaG2P5</b>	<b>40 µg de BaG2P5</b>
<b>24 h</b>	114	161	215	300	387
<b>48 h</b>	205	343	462	625	738

Tabela 2 – Atividade hemolítica indireta da BaG2P5. A atividade de BaG2P5 foi comparada a 30 µg de peçonha bruta de *B. alternatus* (PB) em dois intervalos de tempo diferentes. Os valores estão expressos em mm<sup>2</sup> e representam a área dos halos hemolíticos formados no gel de agarose suplementado com gema de ovo e eritrócitos de camundongo.

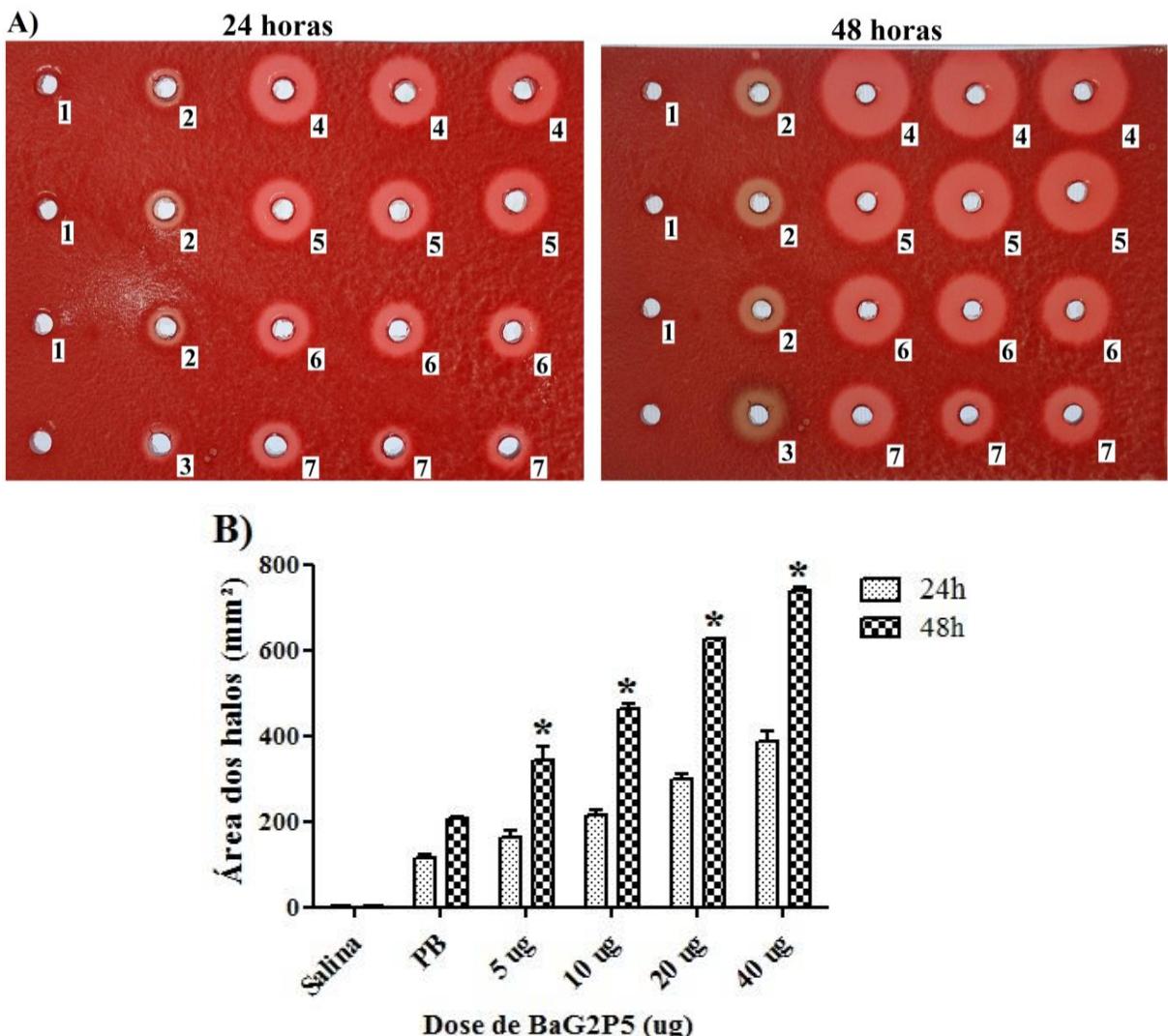


Figura 10 – Atividade hemolítica indireta da BaG2P5. (A) Comparação qualitativa das áreas dos halos hemolíticos induzidos por BaG2P5, em intervalos de tempo diferentes. 1: controle negativo com salina. 2: controle positivo com 30 µg de peçonha bruta de *B. alternatus*. 3: 40 µg do pico G2 da Sephadex G75. 4: 40 µg de BaG2P5. 5: 20 µg de BaG2P5. 6: 10 µg de BaG2P5. 7: 5 µg de BaG2P5. (B) Comparação quantitativa das áreas dos halos (mm<sup>2</sup>) após 24 e 48 horas de incubação. O efeito do tempo foi estatisticamente significativo quando os halos formados por uma mesma dose foram comparados.

Por outro lado, as mesmas doses da enzima foram capazes de induzir a formação de halos de área aproximadamente duas vezes maior quando o intervalo de tempo da atividade foi dobrado. Portanto, o efeito tempo-dependente ocorreu de forma proporcional e foi estatisticamente significativo.

A atividade hemolítica indireta é comumente utilizada na avaliação da presença de uma PLA<sub>2</sub> em amostras proteicas. No caso de BaG2P5, a capacidade de hidrolisar os fosfolipídeos presentes na gema de ovo variou de acordo com a dose e com o tempo de ação empregado. Outras PLA<sub>2</sub>s ácidas de peçonhas botrópicas apresentaram resultados

semelhantes na atividade de hemólise radial indireta, como a Ba SpII RP4 de *B. alternatus* (DENEGRI et al., 2010) e BmooPLA<sub>2</sub> de *B. moojeni* (SILVEIRA et al., 2013) que mostraram ser dose-dependente, e Bl-PLA<sub>2</sub> de *B. leucurus* cujo efeito foi tempo-dependente (NUNES et al., 2011).

### **5.3 Atividade miotóxica**

As peçonhas de serpentes apresentam uma miotoxicidade característica, atribuída principalmente à presença de PLA<sub>2</sub>s capazes de causar a necrose de fibras do músculo esquelético (TEIXEIRA et al., 2003). As PLA<sub>2</sub>s miotóxicas de peçonhas de serpentes induzem nos tecidos musculares uma série de eventos degenerativos, que se iniciam na membrana plasmática das células, levando ao aparecimento de sinais inflamatórios e ao recrutamento de leucócitos, e que culminam na necrose seletiva das células musculares (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003).

O efeito miotóxico de BaG2P5 foi avaliado por meio da análise histopatológica das fibras do músculo gastrocnêmio de camundongos injetados com 50 µg da toxina. Essa análise foi feita em microscopia óptica e avaliou as lesões apresentadas 24 horas após a injeção da fosfolipase A<sub>2</sub> (Figura 11).

Nas Figuras 11A e 11B, o aspecto morfológico normal do tecido muscular é mostrado, nos aumentos de 100 e 400 vezes, respectivamente. Pode-se observar a organização das fibras musculares multinucleadas íntegras, com pouco espaço extracelular entre as mesmas.

Por outro lado, no tecido muscular mostrado na Figura 11C (aumento de 100 x), é possível visualizar vários pontos de infiltração de leucócitos (I) e mionecrose (N) causados pela administração de BaG2P5 no músculo gastrocnêmio. Além disso, as fibras musculares perdem sua estrutura organizacional, com o aparecimento de espaços entre as mesmas por onde migram os leucócitos.

No aumento maior (Figura 11D, 400 x), as alterações morfológicas ficam mais evidentes, destacando-se a presença de infiltrado inflamatório (I), dos vacúolos de necrose celular (N), de hiperemia (\*) e o extravasamento de células sanguíneas do interior dos vasos (seta). Essas alterações são decorrentes da ação miotóxica de BaG2P5, que foi capaz de desencadear uma resposta inflamatória local, incluindo recrutamento de leucócitos, aumento do fluxo sanguíneo e hemorragias.

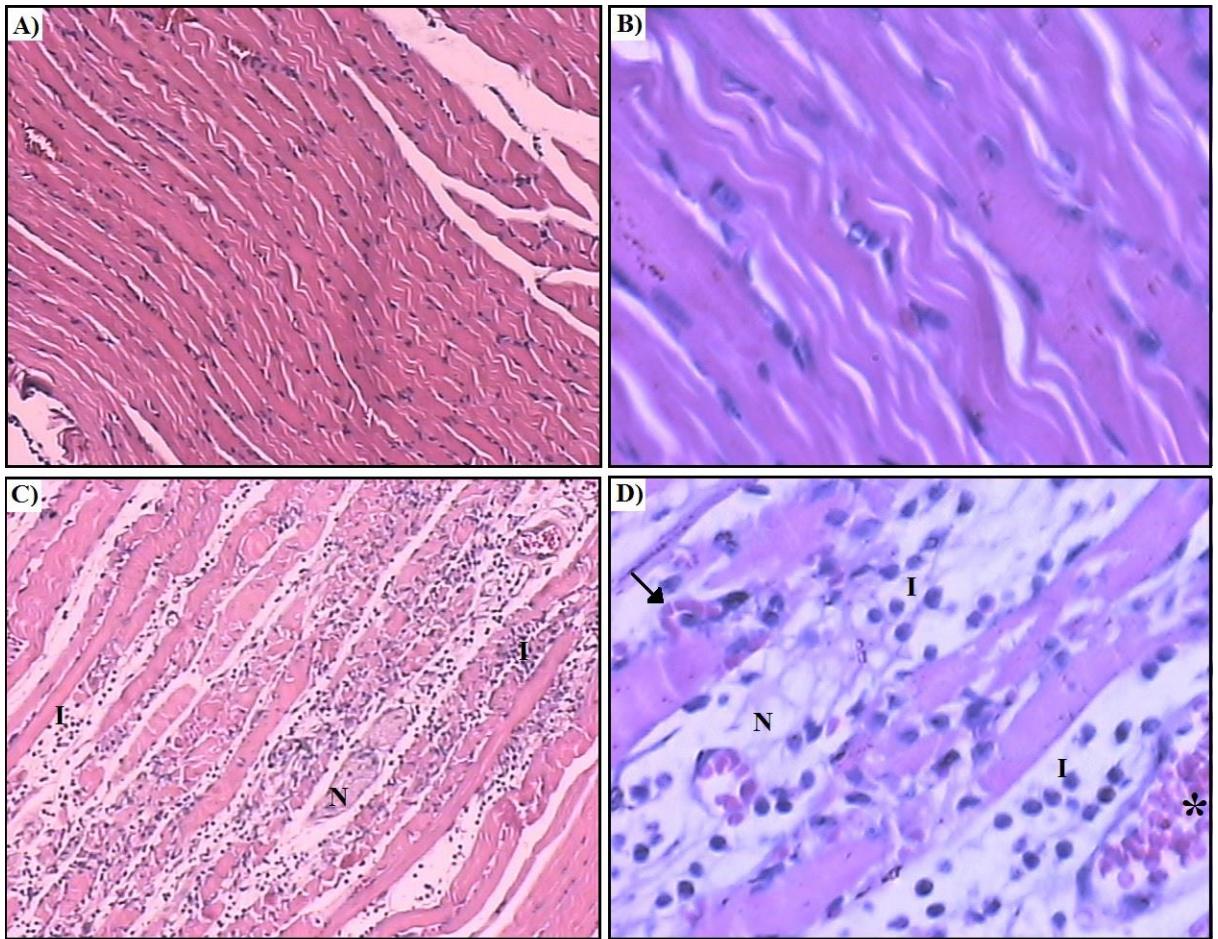


Figura 11 – Análise em microscopia óptica das lesões musculares induzidas por BaG2P5. Fotomicrografias de cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos 24 horas após a injeção de 50 µL de salina em (A) e (B) ou de 50 µg de BaG2P5 em (C) e (D). (A) Aspecto morfológico normal do músculo controle (aumento de 100 vezes). (B) Aspecto morfológico normal do músculo controle (aumento de 400 vezes). (C) Alterações musculares induzidas por BaG2P5 (aumento de 100 vezes). (D) Alterações musculares induzidas por BaG2P5 (aumento de 400 vezes). I: infiltrado leucocitário; N: necrose tecidual. A seta indica hemorragia e o (\*) o aumento do fluxo sanguíneo (hiperemia). Coloração em hematoxilina e eosina.

A miotoxicidade é uma característica marcante das PLA<sub>2</sub>s básicas isoladas de peçonhas de serpentes, como BthTX-I (uma Lys<sup>49</sup>) e BthTX-II (uma Asp<sup>49</sup>) purificadas da peçonha de *B. jararacussu* (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000), e as pMTX-I, pMTX-II, pMTX-III e pMTX-IV encontradas na peçonha de *B. asper* (RUEDA et al., 2013). As PLA<sub>2</sub>s ácidas também podem apresentar efeito citotóxico, como é o caso da BmooTX-I de *B. moojeni* (SANTOS-FILHO et al., 2008) e BpPLA2-TXI de *B. pauloensis* (FERREIRA et al., 2013).

Na peçonha de *B. alternatus* foi encontrada a miotoxina BaTX, uma PLA<sub>2</sub> básica capaz de causar o aumento dos níveis de creatina quinase no plasma quando administrada intramuscularmente em camundongos (PONCE-SOTO et al., 2007). Setúbal et al. (2013) isolaram BaltTX-I, uma PLA<sub>2</sub> Lys<sup>49</sup>, e BaltTX-II, uma PLA<sub>2</sub> Asp<sup>49</sup>, da peçonha de *B.*

*alternatus*. Ambas induziram o aumento dos níveis plasmáticos de creatina quinase no plasma, embora apenas BaltTX-II tenha apresentado atividade enzimática.

Enquanto as demais PLA<sub>2</sub>s miotóxicas isoladas da peçonha de *B. alternatus* foram submetidas aos ensaios cinéticos com creatina-quinase, a capacidade de BaG2P5 destruir as fibras musculares foi avaliada por análise histológica, demonstrando miotoxicidade moderada.

Os mecanismos pelos quais as PLA<sub>2</sub>s causam mionecrose ainda não foram totalmente elucidados. Alguns estudos sugerem que essas enzimas são capazes de se ligar à aceptores lipídicos ou proteicos, presentes na membrana plasmática das células musculares, através de sítios ativos formados por uma combinação de resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos, próximos da região C-terminal da proteína. As interações eletrostáticas entre as PLA<sub>2</sub>s e os aceptores desestabilizam a membrana, permitindo a penetração de PLA<sub>2</sub>s na bicamada lipídica. A ruptura da membrana leva à perda da permeabilidade seletiva e permite a entrada de Ca<sup>2+</sup> no meio intracelular, ativando as proteínas dependentes de Ca<sup>2+</sup> e sobrecarregando as mitocôndrias com esse íon. Essas ações resultam na necrose das células musculares (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003).

Além disso, esses estudos sugerem que a interação das PLA<sub>2</sub>s com a membrana ocorre através de regiões moleculares distintas e independentes do sítio catalítico conhecido. Portanto, as ações que alteram a integridade da membrana plasmática, culminando na lesão do tecido muscular, podem ocorrer independentemente da ação catalítica dessas enzimas (KINI, 2003).

#### **5.4 Atividade edematogênica e hiperalgésica**

As PLA<sub>2</sub>s de peçonhas de serpentes possuem um papel fundamental na reação inflamatória decorrente dos envenenamentos ofídicos. Devido à sua capacidade de hidrolisar fosfolipídeos, essas enzimas causam a liberação de ácidos graxos que atuam como precursores de alguns mediadores da inflamação. Essas moléculas são responsáveis pelo aparecimento dos principais sinais da inflamação no local da picada, como a formação de edema e a diminuição do limiar nociceptivo (ou hiperalgesia) (DENNIS, 1997; KINI, 2003).

Curiosamente, nossos resultados mostraram que BaG2P5 não induz significativamente a formação de edema nem altera o limiar nociceptivo, quando injetada na pata de ratos (Figura 12). Apesar de ter induzido necrose tecidual, quando injetada no músculo gastrocnêmio de camundongos, BaG2P5 apresentou pouco efeito pró-inflamatório ao ser administrada na região intraplantar da pata de ratos.

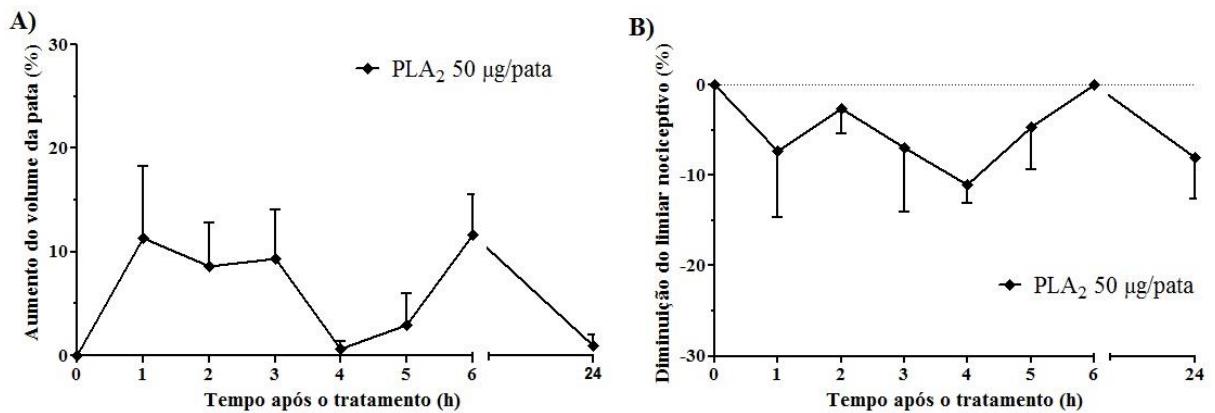


Figura 12 – Efeito da BaG2P5 sobre a formação de edema e limiar nociceptivo. (A) Avaliação do aumento do volume da pata (edema) em diferentes intervalos de tempo após aplicação intraplantar de 50 µg de BaG2P5. (B) Avaliação da diminuição do limiar nociceptivo em diferentes intervalos de tempo após a aplicação de BaG2P5. Os valores de ambos os gráficos foram calculados em relação aos controles (aplicação de salina estéril).

As patas que receberam a injeção de BaG2P5 tiveram um aumento de cerca de 10% do seu volume inicial (Figura 12A). No entanto, esse pequeno aumento não foi estatisticamente significativo e se restringiu às primeiras horas após a aplicação, embora tenha aparecido novamente na sexta hora do intervalo avaliado.

Esse resultado por si só não é suficiente para afirmarmos que BaG2P5 tenha efeito edemato-gênico local, apesar de estarem descritas na literatura muitas PLA<sub>2</sub>s ofídicas capazes de induzir edema. Dentre elas estão BthTX-I e II BthTX-II, da peçonha de *B. jararacussu* (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000) e BnSP-7 de *B. (neuwiedi) pauloensis* (RODRIGUES et al., 1998). Existem também PLA<sub>2</sub>s isoladas da peçonha de *B. alternatus*, como BaTX (PONCE-SOTO et al., 2007) e Ba SpII RP4 (DENEGRI et al., 2010) que foram capazes de induzir a formação de edema na pata de camundongos.

Os mecanismos pelos quais as PLA<sub>2</sub>s estimulam a formação de edema não estão completamente elucidados. Uma das hipóteses é de que as PLA<sub>2</sub>s induzem edema devido à liberação de precursores de eicosanoides e PAF resultante da hidrólise de fosfolipídeos (DENEGRI et al., 2010). No entanto, uma vez que algumas PLA<sub>2</sub>s sem atividade enzimática são capazes de induzir a formação de edema (LANDUCCI et al., 1998), é sugerido que a hidrólise de fosfolipídeos não é essencial para a formação de edema.

A teoria mais aceita é de que a atividade edemato-gênica das PLA<sub>2</sub>s de peçonhas de serpentes seja dependente de sua habilidade de degranular mastócitos, induzindo edema através da exocitose de aminas bioativas. Assim, as PLA<sub>2</sub>s agem sobre essas células que, uma vez ativadas, liberam mediadores vasoativos, como a histamina e a 5-hidroxitriptamina

(serotonina), responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular local que forma o edema (LANDUCCI et al., 1998).

Acredita-se que as PLA<sub>2</sub>s sejam capazes de estimular os mastócitos pela presença de receptores específicos na superfície dessas células, através dos quais as PLA<sub>2</sub>s ativam os sinais que levam à degranulação (LANDUCCI et al., 2000). A ativação de mastócitos pelas PLA<sub>2</sub>s ocorre através de interações eletrostáticas entre as regiões catiônicas da enzima, que têm alta afinidade pela molécula alvo (sítios farmacológicos), e as regiões aniônicas da membrana de mastócitos (KINI; EVANS, 1989). Essa hipótese é sustentada pelo bloqueio da ativação dessas células quando moléculas polianiônicas, como a heparina, competem com os sítios aniônicos pela interação com as PLA<sub>2</sub>s (LANDUCCI et al., 1998).

De acordo com essa teoria, a carga catiônica das PLA<sub>2</sub>s é o principal fator responsável por suas propriedades farmacológicas, pois permite que elas induzam efeitos farmacológicos independentes da atividade enzimática. Da mesma forma que a miotoxicidade, a capacidade das PLA<sub>2</sub>s induzirem a formação de edema não está diretamente relacionada à sua capacidade catalítica. Assim, mesmo uma PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativa, como BaG2P5, pode não causar edema quando administrada *in vivo*.

Além disso, a administração intraplantar de BaG2P5 também teve pouca ou nenhuma ação sobre o limiar nociceptivo dos ratos (Figura 12B). A variação máxima no limiar da dor ocorreu na quarta hora após a inoculação de BaG2P5, embora os demais resultados não sejam estatisticamente significativos. Nesse caso, podemos afirmar que BaG2P5 não alterou o limiar de dor dos animais e, portanto, não apresentou efeito hiperalgésico.

Assim como a formação de edema, a hiperalgesia também é uma das características do processo inflamatório que dependem da liberação de precursores de eicosanoides (ZYCHAR et al., 2010). O efeito edematogênico pouco proeminente de BaG2P5 permite-nos sugerir que essa enzima apresenta pouco ou nenhum efeito sobre as vias de produção desses mediadores inflamatórios, fato que explicaria também sua baixa influência sobre a hiperalgesia (TEIXEIRA et al., 2003).

## **5.5 Ensaio sobre agregação plaquetária**

Neste trabalho também avaliamos a influência da BaG2P5 sobre o mecanismo da agregação plaquetária. Os ensaios foram feitos utilizando ADP, colágeno, ristocetina e epinefrina como agonistas e os resultados são mostrados na Figura 13.

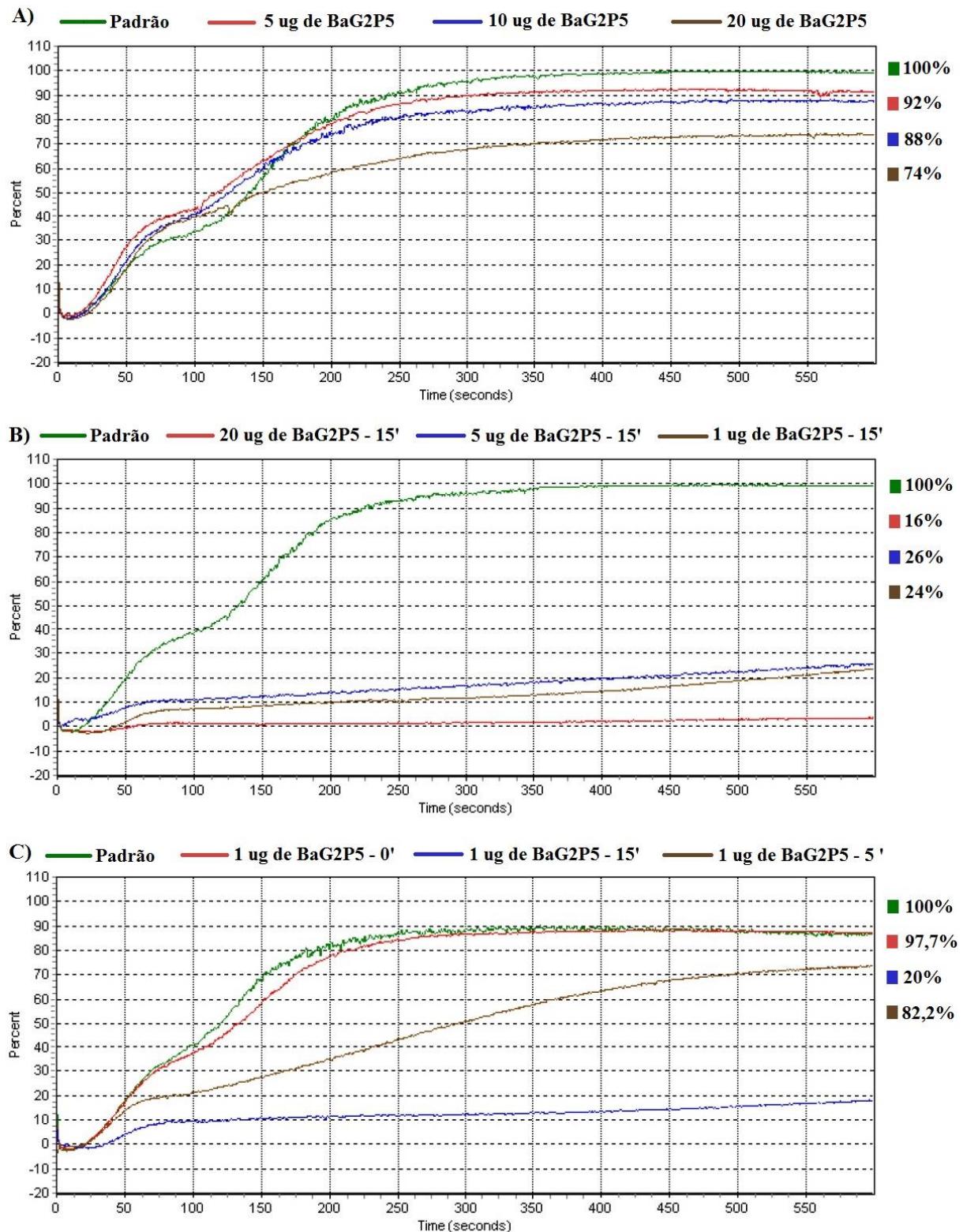


Figura 13 – Efeito da BaG2P5 sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina. (A) Efeito dose-dependente de BaG2P5: a maior dose exibiu o maior efeito antiplaquetário. (B) Efeito dose e tempo-dependente de BaG2P5: três doses diferentes foram submetidas ao mesmo intervalo de pré-incubação. A maior dose foi capaz de inibir maior porcentagem de agregação em relação às outras doses e a à si mesma sem incubação. (C) Efeito tempo-dependente de BaG2P5, mostrando que uma mesma dose tem seu efeito antiplaquetário potencializado quando pré-incubada com o plasma por intervalos diferentes. Legenda: o padrão se refere à agregação induzida pelo agonista. A porcentagem de inibição dos testes é dada pela diferença da agregação atingida em relação ao padrão.

A BaG2P5 foi capaz de inibir apenas a agregação plaquetária induzida por epinefrina de forma dose-dependente, isto é, quanto maior a dose, maior o efeito antiplaquetário (Figura 13A). Assim, a dose de 20 µg inibiu uma porcentagem maior da agregação (26%), enquanto doses menores (5 e 10 µg) não tiveram efeito significativo, inibindo apenas cerca de 10% da agregação.

No teste seguinte, diferentes doses (5, 10 e 20 µg) de BaG2P5 foram pré-incubadas com o plasma por um mesmo intervalo de tempo de 15 minutos (Figura 13B). Com esse período de incubação, doses menores de BaG2P5 foram capazes de causar uma maior inibição da agregação induzida por epinefrina. Assim, a dose de 1 µg inibiu 76% da agregação, enquanto a de 20 µg causou inibição máxima de 84% da agregação plaquetária. Esse resultado mostra que BaG2P5 tem efeito tempo-dependente, pois a mesma dose (20 µg) inibiu mais acentuadamente a agregação quando pré-incubada com o plasma antes da atividade.

O efeito tempo-dependente de BaG2P5 sobre a agregação também foi comprovado pelo teste mostrado na Figura 13C. Nesse ensaio, uma mesma dose da proteína (1 µg) foi incubada com o plasma por diferentes intervalos de tempo (0, 5 e 15 minutos) antes da atividade. Embora a dose de 1 µg de BaG2P5 não tenha exibido efeito antiplaquetário quando testada sem período de pré-incubação, essa mesma dose foi capaz de inibir 80% da agregação após um intervalo de incubação de 15 minutos.

Outras PLA<sub>2</sub>s encontradas em peçonhas ofídicas também apresentaram efeito sobre a agregação plaquetária. BmooTX-I de *B. moojeni* (SANTOS-FILHO et al., 2008) e BpPLA<sub>2</sub>-TXI de *B. pauloensis* (FERREIRA et al., 2013) são capazes de inibir a agregação induzida por colágeno e ADP de forma dose-dependente. Ambas as PLA<sub>2</sub>s demonstraram ser mais potentes na inibição da agregação induzida por colágeno.

As plaquetas desenvolvem um papel central na hemostasia, pois são constituintes do tampão formado para conter a hemorragia nos casos de lesão vascular (KAMIGUTI, 2005). Por isso, moléculas com efeito antiplaquetário são de extrema importância como ferramentas para estudos sobre a hemostasia e que busquem o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para distúrbios do sistema circulatório.

A ativação de receptores glicoproteicos presentes na superfície de plaquetas é responsável pela mudança de conformação, adesão ao endotélio e agregação a outras plaquetas. Estes receptores podem ser ativados por diferentes agonistas (KAMIGUTI, 2005). De acordo com Bernardi e Moreira (2004), a agregação induzida pela epinefrina ocorre através do estímulo de receptores alfa adrenérgicos e sem a mudança inicial na conformação das plaquetas. Assim, com a diminuição da concentração de AMP cíclico intraplaquetário e

imobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre a liberação do ácido araquidônico endógeno, promovendo a formação de tromboxano A<sub>2</sub>, e a contração e secreção plaquetárias. Nos gráficos da Figura 13 é possível observar que a curva de agregação induzida por epinefrina é bifásica. “A primeira onda corresponde à fixação do fibrinogênio ao complexo de glicoproteínas IIb/IIIa da membrana plaquetária, e a segunda onda à formação de TXA<sub>2</sub> e secreção plaquetária” (BERNARDI; MOREIRA, 2004, p. 242).

Alguns estudos afirmam que o efeito antiplaquetário induzido pelas PLA<sub>2</sub>s é devido à ação direta de seu sítio catalítico ou à ação da região C-terminal dessas moléculas (TEIXEIRA et al., 2011). No caso das PLA<sub>2</sub>s enzimaticamente ativas, como BaG2P5, o efeito sobre a agregação pode estar relacionado à clivagem de fosfolipídeos de membrana de plaquetas e à liberação de substâncias, como a prostaciclina, que inibem a agregação plaquetária (FULY et al., 2003). Entretanto, são necessários outros estudos para maiores esclarecimentos acerca do papel de BaG2P5 na agregação plaquetária e suas vias de inibição.

## **5.6 Ensaio de citotoxicidade sobre células tumorais**

O desenvolvimento do câncer é um processo de várias etapas, no qual o genoma das células adquire proto-oncogenes que controlam, direta ou indiretamente, a proliferação celular (RODRIGUES et al., 2009). As peçonhas de serpentes e seus componentes isolados tem sido investigados em relação ao seu efeito citotóxico e antitumoral. De acordo com alguns trabalhos, essas moléculas podem agir diretamente nas células tumorais ou indiretamente, destruindo o microambiente à sua volta que as protege da resposta imune do hospedeiro (MARKLAND, 1986). Além disso, as peçonhas podem causar a liberação de mediadores que dão início ao processo inflamatório, o qual muitas vezes não é desencadeado pelo tumor (BARRAVIERA et al., 1995; LOMONTE; TARKOWSKI; HANSON, 1993).

Muitos dos efeitos antitumorais induzidos pelas peçonhas ofídicas são atribuídos às PLA<sub>2</sub>s, que atuam por meio de mecanismos catalíticos ou não (RODRIGUES et al., 2009). Como visto anteriormente neste trabalho, essas enzimas possuem regiões bioativas distintas do sítio catalítico e apresentam propriedades farmacológicas independentes da hidrólise de fosfolipídeos ou da mobilização de ácido araquidônico, como, por exemplo, a atividade citotóxica (STÁBELI et al., 2006; ZULIANI et al., 2005).

A citotoxicidade da BaG2P5 sobre as células tumorais da linhagem HeLa foi avaliada com base na viabilidade celular, utilizando o método colorimétrico de MTT. Os resultados são mostrados na Figura 14.

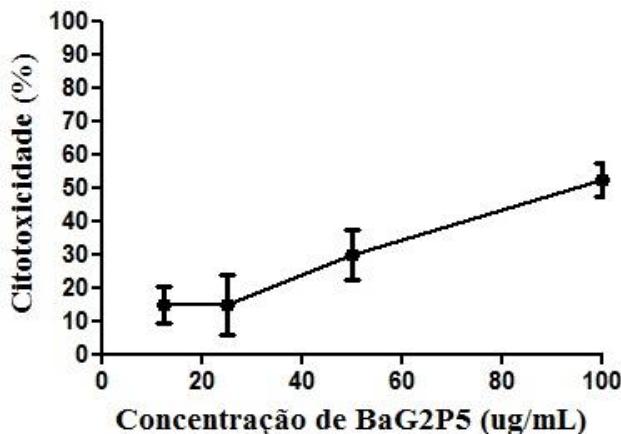


Figura 14 – Citotoxicidade da BaG2P5 sobre células HeLa. Diferentes concentrações da BaG2P5 apresentaram atividade citotóxica sobre a população de células em cultura em diferentes proporções.

Depois de incubadas durante um período de 24 horas com diferentes concentrações (100, 50, 25 e 12,5 μg/mL) de BaG2P5, as populações celulares tiveram sua função mitocondrial avaliada pela adição de MTT. A viabilidade mitocondrial e, consequentemente, a viabilidade celular são quantificadas pela atividade de desidrogenases mitocondriais, como a succinato desidrogenase. Essas enzimas são capazes de reduzir o MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadas e insolúvel em água), porém somente em células metabolicamente ativas e com cadeia respiratória intacta. Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular. A formação de formazan é detectada por meio de leitura da absorbância da reação, de forma que quanto maior o valor encontrado, maior a proporção de células viáveis.

O efeito citotóxico de BaG2P5 foi dose-dependente, isto é, quanto maior a concentração da proteína no meio de cultura, maior a toxicidade sobre as células tumorais. No entanto, apenas concentrações superiores a aproximadamente 95 μg/mL foram capazes de inibir o crescimento de metade da população celular, demonstrando um efeito citotóxico moderado para BaG2P5.

Muitos estudos mostraram o efeito citotóxico e antitumoral de outras PLA<sub>2</sub>s de peçonhas de serpentes (BULTRÓN; GUTIÉRREZ; THELESTAM, 1993; RUDRAMMAJI; GOWDA, 1998; STÁBELI et al., 2006). Dentre elas estão MjTX-II e BmooPLA<sub>2</sub>, isoladas da peçonha de *B. moojeni* e capazes de inibir a proliferação de diversas linhagens de células tumorais (SILVEIRA et al., 2013; STÁBELI et al., 2006). A enzima BmooPLA<sub>2</sub>, uma PLA<sub>2</sub> ácida, foi mais potente ao inibir o crescimento de células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT), seguidas por células T de leucemia aguda (Jurkat) e células de câncer de mama (SK-BR-3).

Nos ensaios realizados, doses de aproximadamente 70 µg/mL seriam capazes de matar 50% das populações de células tumorais analisadas. Em alguns casos, o efeito antitumoral de BmooPLA<sub>2</sub> foi comparável à atividade de metotrexato, um medicamento de referência no tratamento do câncer (SILVEIRA et al., 2013).

Apesar desses resultados, alguns autores afirmam que as PLA<sub>2</sub>s básicas exibem alta toxicidade sobre células tumorais, enquanto as PLA<sub>2</sub>s ácidas apresentam pouca ou nenhuma citotoxicidade (COSTA et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2011). São necessários ainda muitos estudos para a melhor compreensão dos efeitos antitumorais de BaG2P5 e dos mecanismos de ação das PLA<sub>2</sub>s sobre células tumorais.

## 6 CONCLUSÃO

O trabalho realizado levou ao isolamento de uma proteína da peçonha de *B. alternatus*, pertencente à classe das fosfolipases A<sub>2</sub>, denominada BaG2P5 e caracterizada bioquímica e funcionalmente. Essa proteína pode ser descrita como uma PLA<sub>2</sub> ácida de massa molecular igual a 14 kDa e pI de 4,4. A BaG2P5 apresentou alta atividade enzimática e miotóxica, efeito antiplaquetário dependente da dose e do tempo, e atividade citotóxica moderada sobre células de linhagem tumoral HeLa. No entanto, não foi capaz de induzir edema e hiperalgesia intraplantar *in vivo*.

Essa molécula possui grande potencial para estudos futuros, não apenas para melhor caracterização de seus efeitos, mas principalmente como ferramenta para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, a serem utilizados na prevenção e tratamento de distúrbios trombóticos e de câncer.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, V.A.; DAL BELO, C.A.; HERNANDES-OLIVEIRA, S.S.; BORJA-OLIVEIRA, C.R.; HYSLOP, S.; FURTADO, M.F.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 148, n. 1, p. 142-149, 2007.
- ALVARADO, J.; GUTIÉRREZ, J.M. Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae). **Revista de Biología Tropical**, v. 36, n. 2B, p. 563-565, 1988.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; FULY, A.L.; CORRÊA, F.M.A.; ROSA, J.C.; GREENE, L.J.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, p. 723-732, 2002.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANGULO, Y.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, n. 8, p. 755-763, 2000.
- ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A<sub>2</sub> – a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996.
- BALDO, C.; TANJONI, I.; LEÓN, I.R.; BATISTA, I.F.; DELLA-CASA, M.S.; CLISSA, P.B.; WEINLICH, R.; LOPES-FERREIRA, M.; LEBRUN, I.; AMARANTE-MENDES, G.P.; RODRIGUES, V.M.; PERALES, J.; VALENTE, R.H.; MOURA-DA-SILVA, A.M. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 54-65, 2008.
- BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*, *Micrurus* e *Lachesis*. In: MEIRA, D. A. (Org.). **Clínica de doenças tropicais e infecciosas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1991. p. 113-119.
- BARRAVIERA, B. **Venenos:** Aspectos Clínicos e Terapêuticos dos Acidentes por Animais Peçonhentos. (Org.). 1. ed. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Biomédicas Ltda, 1999. 411 p.
- BARRAVIERA, B.; LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A.; MEIRA, D.A. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 1, n. 1, p. 11-22, 1995.
- BERNARDI, P.S.M.; MOREIRA, H.W. Análise dos traçados de ondas da agregação plaquetária em pacientes com doenças cardiovasculares em uso do ácido acetil salicílico comparados a doadores de sangue. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 239-244, 2004.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **Journal of Toxicology and Toxinology**, v. 7, n. 2, p. 121-209, 1988.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 7-16, 2003.

BRASIL. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2009. 816 p.

BRASIL. Ministério da Saúde, Portal da Saúde. **Casos de acidentes por serpentes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2013.** 2014a. Disponível em: <<http://portalsaudesaude.gov.br/images/pdf/2014/julho/10/Tabela-06---CASOS---serpente---2000-a-2013---21-05-2014.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde, Portal da Saúde. **Óbitos por acidentes por serpentes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2013.** 2014b. Disponível em: <<http://portalsaudesaude.gov.br/images/pdf/2014/julho/10/Tabela-08---OBITOS---serpente---2000-a-2013---21-05-2014.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9, p. 851-859, 2000.

BULTRÓN, E.; GUTIÉRREZ, J.M.; THELESTAM, M. Effects of *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin III, a basic phospholipase A<sub>2</sub>, on liposomes and mouse gastrocnemius muscle. **Toxicon**, v. 31, n. 2, p. 217-222, 1993.

BURKE, J.E.; DENNIS, E.A. Phospholipase A<sub>2</sub> biochemistry. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 23, n. 1, p. 49-59, 2009.

CALDERÓN, L.; LOMONTE, B. Immunochemical characterization and role in toxic activities of region 115-129 of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops asper* snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 358, n. 2, p. 343-350, 1998.

CALVETE, J.J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1063-1074, 2005.

CAMEY, K.U.; VELARDE, D.T.; SANCHEZ, E.F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, v. 40, n. 5, p. 501-509, 2002.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD Jr, V. **Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 1. ed. São Paulo: Sarvier/FAPESP, 2003. 459 p.

CARDOSO, K.C.; SILVA, M.J.; COSTA, G.G.L.; TORRES, T.T.; DEL BEM, L.E.; VIDAL, R.O.; MENOSSI, M.; HYSLOP, S. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**, v. 11, p. 605, 2010.

CASTANHEIRA, L.; RODRIGUES, R.S.; BOLDIRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F.;

HENRIQUE-SILVA, F.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; RODRIGUES, V.M. Molecular cloning of a hyaluronidase from *Bothrops pauloensis* venom gland. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 25, p. 1-9, 2014.

CASTANHEIRA, L.; SOUZA, D.L.N.; SILVA, R.J.; BARBOSA, B.; MINEO, J.R.; TUDINI, K.A.; RODRIGUES, R.; FERRO, E.V.; RODRIGUES, V.M. Insights into anti-parasitism induced by a C-type lectin from *Bothrops pauloensis* venom on *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 568-574, 2015.

CHANG, C.C.; SU, M.J. Presynaptic toxicity of the histidine-modified, phospholipase A<sub>2</sub>-inactive, beta-bungarotoxin, crot toxin and notexin. **Toxicon**, v. 20, n. 5, p. 895-905, 1982.

CHAVES, F.; BARBOZA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. **Toxicon**, v. 33, n. 1, p. 31-39, 1995.

CHIOATO, L.; OLIVEIRA, A.H.C.; RULLER, R.; SÁ, J.M.; WARD, R.J. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub>. **The Biochemical Journal**, v. 366, n. 1, p. 971-976, 2002.

CHIOATO, L.; WARD, R.J. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A<sub>2</sub> by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon**, v. 42, n.8, p. 869-883, 2003.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Review article: Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1270-1303, 1991.

CINTRA, A.C.; DE TONI, L.G.; SARTIM, M.A.; FRANCO, J.J.; CAETANO, R.C.; MURAKAMI, M.T.; SAMPAIO, S.V. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 70-82, 2012.

CISCOTTO, P.; MACHADO-DE-ÁVILA, R.A.; COELHO, E.A.; OLIVEIRA, J.; DINIZ, C.G.; FARÍAS, L.M.; CARVALHO, M.A.; MARIA, W.S.; SANCHEZ, E.F.; BORGES, A.; CHAVEZ-OLÓRTEGUI, C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 3, p. 330-341, 2009.

CLARK, J.D.; LIN, L.L.; KRIZ, R.W.; RAMESHA, C.S.; SULTZMAN, L.A.; LIN, A.Y.; MILONA, N.; KNOPF, J.L. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA<sub>2</sub> contains a Ca<sup>2+</sup>-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. **Cell**, v. 65, n. 6, p. 1043-1051, 1991.

CLEMETSON, K.J.; NAVDAEV, A.; DÖRMANN, D.; DU, X.Y.; CLEMETSON, J.M. Multifunctional snake C-type lectins affecting platelets. **Haemostasis**, v. 31, n. 6, p. 148-154, 2001.

COSTA, H.C.; BÉRNILS, R.S. Répteis brasileiros: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v. 3, n. 3, p. 74-84, 2014.

COSTA, J.O.; FONSECA, K.C.; MAMEDE, C.C.N.; BELETTI, M.E.; SANTOS-FILHO, N.A.; SOARES, A.M.; ARANTES, E.C.; HIRAYAMA, S.N.S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; FONSECA, F.; HENRIQUE-SILVA, F.; PENHA-SILVA, N.; OLIVEIRA, F. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1365-1377, 2010.

COSTA, T.R.; MENALDO, D.L.; OLIVEIRA, C.Z.; SANTOS-FILHO, N.A.; TEIXEIRA, S.S.; NOMIZO, A.; FULY, A.L.; MONTEIRO, M.C.; SOUZA, B.M.; PALMA, M.S.; STÁBELI, R.G.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1645-1656, 2008.

DEITCHER, S.R.; TOOMBS, C.F. Non-clinical and clinical characterization of a novel acting thrombolytic: alfimeprase. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 34, n. 4, p. 215-220, 2005.

DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C.A.; TOYAMA, M.H.; CAVADA, B.S. Crystal structure of Bn IV in complex with myristic acid: A Lys<sup>49</sup> myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops neuwiedi* venom. **Biochimie**, v. 93, n. 3, p. 513-518, 2010.

DENEGRI, M.E.G.; ACOSTA, O.C.; HUANCAHUIRE-VEGA, S.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S.; MARUÑAK, S.L.; TEIBLER, G.P.; LEIVA, L.C.; PONCE-SOTO, L.A. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA<sub>2</sub> Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. **Toxicon**, v. 56, n. 1, p. 64-74, 2010.

DENEGRI, M.E.G.; MARUÑAK, S.; TODARO, J.S.; PONCE-SOTO, L.A.; ACOSTA, O.; LEIVA, L. Neutralisation of the pharmacological activities of *Bothrops alternatus* venom by anti-PLA<sub>2</sub> IgGs. **Toxicon**, v. 86, p. 89-95, 2014.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A<sub>2</sub>. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 18, p. 13057-13060, 1994.

DENNIS, E.A. History, classification, structure and function of phospholipase A<sub>2</sub>. In: UHL, W.; NEVALAINEN, T.J.; BÜCHLER, M.W. (Eds.). **Phospholipase A<sub>2</sub>: Basic and Clinical Aspects in Inflammatory Diseases**. 1. ed. Basel: Karger, 1997. p. 1-7.

DÍAZ-OREIRO, C.; GUTIÉRREZ, J.M. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 241-252, 1997.

DOLEY, R.; ZHOU, X.; KINI, M. Snake Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes. In: MACKESSY, S.P. (Ed.). **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. 1. ed. Londres: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2009. p. 173-205.

DU, X.Y.; SIM, D.S.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. Blood cells as targets of snake toxins. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 36, n. 3, p. 414-421, 2006.

ESPINO-SOLIS, G.P.; RIÑO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L.D. Antidotes against venomous animals: state of the art and prospectives. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 183-199, 2009.

FALCAO, C.B.; DE LA TORRE, B.G.; PÉREZ-PEINADO, C.; BARRON, A.E.; ANDREU, D.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Vipericidins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. **Amino Acids**, v. 46, n. 11, p. 2561-2571, 2014.

FERREIRA, F.B.; GOMES, M.S.R.; SOUZA, D.L.N.; GIMENES, S.N.C.; CASTANHEIRA, L.E.; BORGES, M.H.; RODRIGUES, R.S.; YONEYAMA, K.A.G.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; RODRIGUES, V.M. Molecular Cloning and Pharmacological Properties of an Acidic PLA<sub>2</sub> from *Bothrops pauloensis* Snake Venom. **Toxins**, v. 5, n. 12, p. 2403-2419, 2013.

FERREIRA, S.H.; BARTELT, D.C.; GREENE, L.J. Isolation bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n. 13, p. 2583-2593, 1970.

FONTES, M.R.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; FERNANDES, A.C.; SILVA, R.J.; GIGLIO, J.R. Crystallization and preliminar X-ray diffraction analysis of a myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1432, n. 2, p. 393-395, 1999.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Structural considerations of the snake venom metalloproteases, key members of the M12 reprotoxin family of metalloproteases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969-985, 2005.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD Jr, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes**. 1. ed. São Paulo: Sarvier/FAPESP, 2003. p. 123-130.

FULY, A.L.; CALIL-ELIAS, S.; MARTINEZ, A.M.; MELO, P.A.; GUIMARÃES, J.A. Myotoxicity induced by an acidic Asp-49 phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Lachesis muta* snake venom. Comparison with lysophosphatidylcholine. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 10, p. 1470-1481, 2003.

FULY, A.L.; MACHADO, O.L.; ALVES, E.W.; CARLINI, C.R. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 78, n. 5, p. 1372-1380, 1997.

FUNG, S.Y.; LEE, M.L.; TAN, N.H. Molecular mechanism of cell death induced by king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 96, p. 38-45, 2015.

GENTRY, P.A. Comparative aspects of blood coagulation. **Veterinary Journal**, v. 168, n. 3, p. 238-251, 2004.

GIMENES, S.N.C. **Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de fosfolipase A<sub>2</sub> do tipo γ isolado do soro de *Crotalus durissus collilineatus***. 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia,

2013.

GOMES, M.S.R.; DE QUEIROZ, M.R.; MAMEDE, C.C.N.; MENDES, M.M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SOUSA, M.V.; AQUINO, E.N.; CASTRO, M.S.; OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V.M. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (*BleucMP*) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 3, p. 290-300, 2011.

GROSS, R.W.; RAMANADHAM, S.; KRUSZKA, K.K.; HAN, X.; TURK, J. Rat and human pancreatic islet cells contain a calcium ion independent phospholipase A<sub>2</sub> activity selective for hydrolysis of arachidonate which is stimulated by adenosine triphosphate and is specifically localized to islet beta-cells. **Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 327-336, 1993.

GUTIÉRREZ, J.M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26, n. 4, p. 411-413, 1988.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 51, n. 14, p. 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; RUCAVADO, A. CHAVES, F.; ÂNGULO, Y. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 28, p. 2935-2950, 2007.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinase: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9, p. 841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J.M.; THEAKSTON, R.D.; WARRELL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 6, p. 727-731, 2006.

HARRIS, J.B. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> and the regeneration of skeletal muscles. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 933-945, 2003.

HARVEY, A.L. Toxins and drug discovery. **Toxicon**, v. 92, p. 193-200, 2014.

HAZEN, S.L.; FORD, D.A.; GROSS, R.W. Activation of a membrane-associated phospholipase A<sub>2</sub> during rabbit myocardial ischemia which is highly selective for plasmalogen substrate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 9, p. 5629-5633, 1991.

HEINRIKSON, R.L.; KRUEGER, E.T.; KEIM, P.S. Amino Acid Sequence of Phospholipase

A<sub>2</sub> from the Venom of *Crotalus adamanteus*. **Journal of the Biological Chemistry**, v. 252, n. 14, p. 4913-4921, 1977.

HIGUCHI, D.A.; BARBOSA, C.M.V.; BINCOLETTTO, C.; CHAGAS, J.R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F.; PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; PESQUERO, J.L. Purification and partial characterization of two phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, n. 3, p. 319-328, 2007.

HIRABAYASHI, J.; KUSUNOKI, T.; KASAI, K. Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*: Homologies with Ca<sup>2+</sup>-dependent-type lectins. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 4, p. 2320-2326, 1991.

HUANG, T.F.; HOLT, J.C.; LUKASIEWICZ, H.; NIEWIAROWSKI, S. Trigamin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, n. 33, p. 16157-16163, 1987.

JUAN, F.C.; THOMAZINI, I.A.; GIANINI, M.J.M.; VITERBO, F.; TOSCANO, E.; MORAES, R.A.; BARRAVIERA, B. Reparation of peripheral nerves with fibrin glue prepared from snake venom. Preliminary results. **São Paulo Medical Journal**, v. 113, n. 5, p. 1000-1002, 1995.

KAMIGUTI, A.S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1041-1049, 2005.

KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.; THEAKSTON, R.D.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, n. 6, p. 627-642, 1996.

KAMIGUTI, A.S.; SANO-MARTINS, I.S. South american snake venoms affecting haemostasis. **Toxin Reviews**, v. 14, n. 3, p. 359-374, 1995.

KAMIGUTI, A.S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R.D. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 7, p. 853-862, 1998.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A.R.; SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALOO, D.G.; SILVA, H.J. Estimating the global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 11, p. 1591-1604, 2008.

KEMPARAJU, K.; GIRISHY, K.S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. **Cell Biochemistry and Function**, v. 24, n. 1, p. 7-12, 2006.

KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.

KINI, R.M. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms.

**Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 34, n. 4, p. 200-204, 2005.

KINI, R.M.; CHAN, Y.M. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Journal of molecular evolution**, v. 48, n. 2, p. 125-132, 1999.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v. 27, n. 6, p. 613-635, 1989.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. Effects of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes on platelet aggregation. In: KINI, R.M. (Ed.). **Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1997. p. 369-387.

KOH, D.C.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 24, p. 3030-3041, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 277, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANDUCCI, E.C.; CASTRO, R.C.; PEREIRA, M.F.; CINTRA, A.C.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A<sub>2</sub> homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **European Journal of Pharmacology**, v. 343, n. 2, p. 257-263, 1998.

LANDUCCI, E.C.; TOYAMA, M.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Effect of crotapotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v. 38, n. 2, p. 199-208, 2000.

LAYNE, E. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. **Methods in Enzymology**, v. 3, p. 447-454, 1957.

LEHMAN, J.J.; BROWN, K.A.; RAMANADHAM, S.; TURK, J.; GROSS, R.W. Arachidonic acid release from aortic smooth muscle cells induced by [Arg<sup>8</sup>] vasopressin is largely mediated by calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 28, p. 13-16, 1993.

LEME, A.F.; ESCALANTE, T.; PEREIRA, J.G.; OLIVEIRA, A.K.; SANCHEZ, E.F.; GUTIÉRREZ, J.M.; SERRANO, S.M.; FOX, J.W. High resolution analysis of snake venom metalloproteinase (SVMP) peptide bond cleavage specificity using proteome based peptide libraries and mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 4, p. 401-410, 2011.

LEONARDI, A.; FOX, J.W.; TRAMPUS-BAKIJA, A.; KRIZAJ, I. Ammodytase, a metalloprotease from *Vipera ammodytes ammodytes* venom, possesses strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, v. 49, n. 6, p. 833-842, 2007.

LLORET, S.; MORENO, J.J. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A<sub>2</sub> purified from porcine pancreas and snake venoms. **Toxicon**, v. 31, n. 8, p. 949-956, 1993.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885-901, 2003.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARIA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venoms. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 307-312, 2003.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 27, n. 7, p. 725-733, 1989.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**, v. 17, n. 2, p. 93-105, 1993.

LUCENA, S.; CASTRO, R.; LUNDIN, C.; HOFSTETTER, A.; ALANIZ, A.; SUNTRAVAT, M.; SÁNCHEZ, E.E. Inhibition of pancreatic tumoral cells by snake venom disintegrins. **Toxicon**, v. 93, p. 136-143, 2015.

MACÊDO, J.K.A. **Análise da peçonha de *Bothropoides marmoratus*, com ênfase na caracterização de proteínas com atividade antimicrobiana e/ou antitumoral.** 2011. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

MAGALHÃES, A.; MAGALHÃES, H.P.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S.; FERREIRA, R.N.; ALMEIDA, A.P.; SANCHEZ, E.F. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part. A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 565-575, 2007.

MAGRO, A.J.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A<sub>2</sub>: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 311, n. 3, p. 713-720, 2003.

MAITY, G.; MANDAL, S.; CHATTERJEE, A.; BHATTACHARYYA, D. Purification and characterization of a low molecular weight multifunctional cytotoxic phospholipase A<sub>2</sub> from *Russell's viper* venom. **Journal of chromatography, B: Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 845, n. 2, p. 232-243, 2007.

MAMEDE, C.C.N. **Caracterização bioquímica e funcional de uma metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*.** 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

MARKLAND, F.S. Antitumor action of crotalase, a defibrinogenating snake venom enzyme. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 12, n. 4, p. 284-290, 1986.

MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800, 1998.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1171-1181, 2005.

MARUÑAK, S.L.; LEIVA, L.; DENEGRI, M.E.G.; TEIBLER, P.; ACOSTA DE PÉREZ, O. Isolation and biological characterization of a basic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biocell**, v. 31, n. 3, p. 355-364, 2007.

MATRISIAN, L.M. Metalloproteinases and the inhibitors in matrix remodeling. **Trends in Genetics**, v. 6, n. 4, p. 121-125, 1990.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Review: Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1, p. 146-156, 2000.

MITRA, J.; BHATTACHARYYA, D. Phosphodiesterase from *Daboia russelli russelli* venom: Purification, partial characterization and inhibition of platelet aggregation. **Toxicon**, v. 88, p. 1-10, 2014.

MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J.M.; AMARAL, R.B.; ZAMUNÉR, S.R.; TEIXEIRA, C.F. Effects of *Bothrops asper* snake venom on the expression of cyclooxygenases and production of prostaglandins by peritoneal leukocytes *in vivo*, and by isolated neutrophils and macrophages *in vitro*. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 80, n. 3, p. 107-114, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, A.B.; MIELE, L.; PATTABIRAMAN, N. Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: regulation and physiological role. **Biochemical pharmacology**, v. 48, n. 1, p. 1-10, 1994.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A<sub>2</sub>. **Journal of biochemistry**, v. 131, n. 3, p. 285-292, 2002.

MURAKAMI, M.; TADA, K.; SHIMBARA, S.; KAMBE, T.; SAWADA, H.; KUDO, I. Detection of secretory phospholipase A<sub>2</sub>s related but not identical to type IIA isozyme in cultured mast cells. **FEBS letters**, v. 413, n. 2, p. 249-254, 1997.

NISHIOKA, S.A.; SILVEIRA, P.V. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, n. 6, p. 805-810, 1992.

NUNES, D.C.O.; FIGUEIRA, M.M.N.R.; LOPES, D.S.; SOUZA, D.L.N.; IZIDORO, L.F.M.; FERRO, E.A.V.; SOUZA, M.A.; RODRIGUES, R.S.; RODRIGUES, V.M.; YONEYAMA, K.A.G. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology**, v. 140, p. 844-854, 2013.

NUNES, D.C.O.; RODRIGUES, R.S.; LUCENA, M.N.; COLOGNA, C.T.; OLIVEIRA, A.C.S.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; ARANTES, E.C.; TEIXEIRA, D.N.S.; UEIRA-VIEIRA, C.; RODRIGUES, V.M. Isolation and functional characterization

of proinflammatory acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C**, v. 154, n. 3, p. 226-233, 2011.

OHNO, M.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; HATTORI, S. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venom. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 841-854, 2003.

OLIVEIRA, C.F.; LOPES, D.S.; MENDES, M.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; HAMAGUCHI, A.; ALCÂNTARA, T.M.; CLISSA, P.B.; RODRIGUES, V.M. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedi) pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 5, p. 560-569, 2009.

OLIVEIRA, F. **Novas proteases da peçonha de *Bothrops moojeni* (Caiçaca): Purificação de quatro isoformas de fibrinogenases (Bth $\alpha$ s) e caracterização bioquímica da BthTl.** 2001. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2001.

OLIVO, R.A.; TEIXEIRA, C.F.P.; WALLACE, J.L.; GUTIÉRREZ, J.M.; ZAMUNER, S.R. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon**, v. 49, n. 5, p. 670-677, 2007.

OMS. **Neglected tropical diseases.** 03 nov. 2008. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/integrated\\_media\\_snakebite/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media_snakebite/en/)>. Acesso em: 15 jan. 2015.

OUYANG, C.; HUANG, T. Inhibition of platelet aggregation by 5' -nucleotidase purified from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Toxicon**, v. 21, n. 4, p. 491-501, 1983.

OWNBY, C.L. Structure, Function and Biophysical Aspects of the Myotoxins from Snake Venoms. **Toxin reviews**, v. 17, n. 2, p. 213-238, 1998.

OWNBY, C.L.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins. **Toxicon**, v. 37, n. 3, p. 411-445, 1999.

PAL, S.K.; GOMES, A.; DASGUPTA, S.C.; GOMES, A. Snake venom as therapeutic agentes: From toxin to drug development. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 40, n. 12, p. 1353-1358, 2002.

PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J.A.; GORVEL, J.P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops asper* snake venom – synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. **European journal of biochemistry**, v. 254, n. 2, p. 452-461, 1998.

PÉREZ, A.V.; RUCAVADO, A.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; GUTIÉRREZ, J.M. Isolation and characterization of a serine proteinase with thrombin-like activity from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 1, p. 12-17, 2008.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 79, n. 3, p. 675-683, 1998.

POLGÁR, J.; MAGNENAT, E.M.; PEITSCH, M.C.; WELLS, T.N.; CLEMETSON, K.J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M(r) phospholipases A<sub>2</sub>: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A<sub>2</sub>, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Biochemical Journal**, v. 319, p. 961-968, 1996.

PONCE-SOTO, L.A.; BARROS, J.C.; MARANGONI, S.; HERNANDEZ, S.; DAL BELO, C.A.; CORRADO, A.P.; HYSLOP, P.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA<sub>2</sub> isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C**, v. 150, n. 2, p. 291-297, 2009.

PONCE-SOTO, L.A.; BONFIM, V.L.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA<sub>2</sub> D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using *in vitro* neuromuscular preparation. **Protein Journal**, v. 25, n. 2, p. 147-155, 2006.

PONCE-SOTO, L.A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 4, p. 585-593, 2007.

PONZONI, M.; CORNAGLIA-FERRARIS, P. Interferon-gamma-stimulated and GTP-binding-proteins-mediated phospholipase A<sub>2</sub> activation in human neuroblasts. **Biochemical Journal**, v. 294, n. 3, p. 893-898, 1993.

RAMANADHAM, S.; GROSS, R.W.; HAN, X.; TURK, J. Inhibition of arachidonate release by secretagogue-stimulated pancreatic islets suppresses both insulin secretion and the rise in beta-cell cytosolic calcium ion concentration. **Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 337-346, 1993.

RAMOS, O.H.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Review: snake venom metalloproteases: structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 142, n. 3, p. 328-346, 2006.

RANDALL, L.O.; SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 111, n. 4, p. 409-419, 1957.

ROCHA, M.M.T.; FURTADO, M.F.D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 2, p. 383-393, 2005.

RODRIGUES, R.S.; IZIDORO, L.F.M.; OLIVEIRA J.R., R.J.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Snake Venom Phospholipases A<sub>2</sub>: A New Class of Antitumor Agents. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, p. 894-898, 2009.

RODRIGUES, R.S.; IZIDORO, L.F.M.; TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; FULY, A.L.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, n. 1, p. 153-165, 2007.

RODRIGUES, V.M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R.S.; ARAÚJO, A.L.; MALTA-NETO, N.R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E.A.V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 305-314, 2004.

RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 381, n. 2, p. 213-224, 2000.

RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; MANCIN, A.C.; FONTES, M.R.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part A**, v. 121, n. 3, p. 215-222, 1998.

RUDRAMMAJI, L.M.; GOWDA, T.V. Purification and characterization of three acidic, cytotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. **Toxicon**, v. 36, n. 6, p. 921-932, 1998.

RUEDA, A.Q.; RODRÍGUEZ, I.G.; ARANTES, E.C.; SETÚBAL, S.S.; CALDERON, L.A.; ZULIANI, J.P.; STÁBELI, R.G.; SOARES, A.M. Biochemical Characterization, Action on Macrophages, and Superoxide Anion Production of Four Basic Phospholipases A<sub>2</sub> from Panamanian *Bothrops asper* Snake Venom. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 627-645, 2011.

SALVADOR, G.H.M.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; SILVEIRA, L.B.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of BmooPLA<sub>2</sub>-I, a platelet-aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops moojeni* venom. **Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 67, p. 900-902, 2011.

SAMY, R.P.; KANDASAMY, M.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; STILES, B.G.; ROWAN, E.G.; BECKER, D.; SHANMUGAM, M.K.; SETHI, G.; CHOW, V.T.K. Wound Healing Activity and Mechanisms of Action of an Antibacterial Protein from the Venom of the Eastern Diamondback Rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1-16, 2014.

SANCHEZ, E.F.; SCHNEIDER, F.S.; YARLEQUE, A.; BORGES, M.H.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S.G.; EVANGELISTA, K.S.; EBLE, J.A. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 496, n. 1, p. 9-20, 2010.

SANTOS, J.I.; CARDOSO, F.F.; SOARES, A.M.; SILVA, M.P.; GALLACCI, M.; FONTES, M.R.M. Structural and Functional Studies of a Bothropic Myotoxin Complexed to Rosmarinic Acid: New Insights into Lys49-PLA<sub>2</sub> Inhibition. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. 1-11, 2011.

SANTOS-FILHO, N.A.; SILVEIRA, L.B.; OLIVEIRA, C.Z.; BERNARDES, C.P.; MENALDO, D.L.; FULY, A.L.; ARANTES, E.C.; SAMPAIO, S.V.; MAMEDE, C.C.; BELETTI, M.E.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A.M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I<sub>2</sub> inductor phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 908-917, 2008.

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, 2006.

SCOTT, D.L.; WHITE, S.P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M.H.; SIGLER, P.B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>. **Science**, v. 250, n. 4987, p. 1541-1546, 1990.

SERRANO, S.M.; JIA, L.G.; WANG, D.; SHANNON, J.D.; FOX, J.W. Function of the cysteine-rich domain of the haemorrhagic metalloproteinase atrolysin A: targeting adhesion proteins collagen I and von Willebrand factor. **The Biochemical Journal**, v. 391, n. 1, p. 69-76, 2005.

SERRANO, S.M.; MAROUN, R.C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115-1132, 2005.

SERRANO, S.M.; REICHL, A.P.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E.A.; SANTORO, M.L.; SAMPAIO, C.A.; CAMARGO, A.C.; ASSAKURA, M.T. A novel phospholipase A<sub>2</sub>, BJ-PLA<sub>2</sub>, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 367, n. 1, p. 26-32, 1999.

SETÚBAL, S.S.; PONTES, A.S.; FURTADO, J.L.; XAVIER, C.V.; SILVA, F.L.; KAYANO, A.M.; IZIDORO, L.F.M.; SOARES, A.M.; CALDERON, L.A.; STÁBELI, R.G.; ZULIANI, J.P. Action of Two Phospholipases A<sub>2</sub> Purified from *Bothrops alternatus* Snake Venom on Macrophages. **Biochemistry**, v. 78, n. 2, p. 194-203, 2013.

SILVEIRA, L.B. **Caracterização funcional e estrutural de uma nova fosfolipase A<sub>2</sub> ácida de *Bothrops moojeni***. 2011. 111 f. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

SILVEIRA, L.B.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; SANTOS-FILHO, N.A.; SILVA JR., F.P.; MARCUSSI, S.; FULY, A.L.; NOMIZO, A.; SILVA, S.L.; STÁBELI, R.G.; ARANTES, E.C.; SOARES, A.M. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops moojeni* snake venom. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 35-43, 2013.

SIX, D.A.; DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, n. 2, p. 1-19, 2000.

SOARES, A.M. Use of Snake Venom for Biomedical Researches and Drug Development. **SOAJ of Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, p. 1-3, 2012.

SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; BORTOLETO, R.K.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; ARNI, R.K.; WARD, R.J.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops pirajai* snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 387, n. 2, p. 188-196, 2001.

SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R. Phospholipase A<sub>2</sub> Myotoxins from *Bothrops* Snake Venoms: Structure- Function Relationship. **Current Organic Chemistry**, v. 8, n. 17, p. 1677-1690, 2004.

SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R. Chemical modifications of phospholipases A<sub>2</sub> from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 855-868, 2003.

SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.R.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Structural and Functional Characterization of BnSP-7, a Lys49 Myotoxic Phospholipase A<sub>2</sub> Homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, n. 2, p. 201-209, 2000.

SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; TOYAMA, M.H.; LOMBARDI, F.R.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematosgenic activity. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 503-514, 1998.

SOUZA, D.L.N.; GOMES, M.S.R.; FERREIRA, F.B.; RODRIGUES, R.S.; ACHÊ, D.C.; RICHARDSON, M.; BORGES, M.H.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and enzymatic characterization of BpMP-I, a fibrinogenolytic metalloproteinase isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 161, n. 2, p. 102-109, 2012.

STÁBELI, R.G.; AMUI, S.F.; SANT'ANA, C.D.; PIRES, M.G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M.C.; ROMÃO, P.R.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.; SOARES, A.M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative biochemistry and physiology. C – Toxicology & pharmacology**, v. 142, n. 4, p. 371-381, 2006.

STOCKER, K.; BARLOW, G.H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin). **Methods in Enzymology**, v. 45, p. 214-223, 1976.

SUZUKI, N.; ISHIZAKI, J.; YOKOTA, Y.; HIGASHINO, K.; ONO, T.; IKEDA, M.; FUJII, N.; KAWAMOTO, K.; HANASAKI, K. Structures, enzymatic properties and expression of novel human and mouse secretory phospholipases A<sub>2s</sub>. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 8, p. 5785-5793, 2000.

SWENSON, S.; MARKLAND, F.S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1021-1039, 2005.

TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v. 54, n. 1, p. 67-76, 2009.

TEIXEIRA, C.F.; LANDUCCI, E.C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 947-962, 2003.

TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; SILVA, F.M.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; SILVA Jr., F.P.; IZIDORO, L.F.M.; FULY, A.L.; JULIANO, M.A.; SANTOS, C.R.; MURAKAMI, M.T.; SAMPAIO, S.V.; SILVA, S.L.; SOARES, A.M. Molecular characterization of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. **Archives of toxicology**, v. 85, n. 10, p. 1219-1233, 2011.

TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 55-68, 2006.

TÖNISMÄGI, K.; SAMEL, M.; TRUMMAL, K.; RONNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E. L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. **Toxicon**, v. 48, n. 2, p. 227-237, 2006.

TREBIEN, H.A.; CALIXTO, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents and Actions**, v. 26, n. 4, p. 292-300, 1989.

TRUMMAL, K.; AASPÖLLU, A.; TÖNISMÄGI, K.; SAMEL, M.; SUBBI, J.; SIIGUR, J.; SIIGUR, E. Phosphodiesterase from *Vipera lebetina* venom – Structure and Characterization. **Biochimie**, v. 106, p. 48-55, 2014.

TRUMMAL, K.; SAMEL, M.; AASPÖLLU, A.; TÖNISMÄGI, K.; TITMA, T.; SUBBI, J.; SIIGUR, J.; SIIGUR, E. 5'-Nucleotidase from *Vipera lebetina* venom. **Toxicon**, v. 93, p. 155-163, 2015.

USAMI, Y.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; SHIMA, H.; YOSHIDA, E.; YOSHIOKA, A.; HIRANO, K.; SUZUKI, M.; TITANI, K. A 28-kDa Protein with Disintegrin-like Structure (Jararhagin-C) Purified from *Bothrops jararaca* Venom Inhibits Collagen and ADP Induced Platelet Aggregation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 201, n. 1, p. 331-339, 1994.

VALENTÍN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipase A<sub>2</sub> tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipase A<sub>2</sub>. **Biochimie**, v. 82, n. 10, p. 815-821, 2000.

VALERIANO-ZAPANA, J.A.; SEGOVIA-CRUZ, F.S.; ROJAS-HUALPA, J.M.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, S. Functional and structural characterization of a new serine protease with thrombin-like activity TLBan from *Bothrops andianus* (Andean Lancehead) snake venom. **Toxicon**, v. 59, n. 2, p. 231-240, 2012.

VAN ARMAN, C.G.; BEGAN, A.J.; MILLER, L.M.; PLESS, H.H. Some details of

inflammation caused by yeast and carrageenan. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 150, p. 328-334, 1965.

VERHEIJ, H.M.; VOLWERK, J.J.; JANSEN, E.H.; PUYK, W.C.; DIJKSTRA, B.W.; DRENTH, J.; DE HAAS, G.H. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>: Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry**, v. 19, n. 4, p. 743-750, 1980.

WANG, M.C.; PINS, G.D.; SILVER, F.H. Preparation of fibrin glue: the effects of calcium chloride and sodium chloride. **Materials science & engineering: C**, v. 3, n. 2, p. 131-135, 1995.

WARD, R.J.; CHIOATO, L.; OLIVEIRA, A.H.; RULLER, R.; SÁ, J.M. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub>: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **The Biochemical Journal**, v. 362, n. 1, p. 89-96, 2002.

WARD, R.J.; OLIVEIRA, A.H.C.; BORTOLETO, R.K.; ROSA, J.C.; FAÇA, V.M.; GREENE, L.J. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 21, n. 1, p. 134-140, 2001.

WENSON, S.; COSTA, F.; MINEA, R.; SHERWIN, R.P.; ERNST, W.; FUJII, G.; YANG, D.; MARKLAND, F.S. Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression. **Molecular cancer therapeutics**, v. 3, n. 4, p. 499-511, 2004.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 951-967, 2005.

XIN, Y.; CHOO, Y.M.; HU, Z.; LEE, K.S.; YOON, H.J.; CUI, Z.; SOHN, H.D.; JIN, B.R. Molecular cloning and characterization of a venom phospholipase A<sub>2</sub> from the bumblebee *Bombus ignitus*. **Comparative biochemistry and physiology, Part B: Biochemistry & molecular biology**, v. 154, n. 2, p. 195-202, 2009.

YUAN, Y.; JACKSON, S.P.; MITCHELL, C.A.; SALEM, H.H. Purification and characterization of a snake venom phospholipase A<sub>2</sub>: A potent inhibitor of platelet aggregation. **Thrombosis Research**, v. 70, n. 6, p. 471-481, 1993.

ZOUARI-KESSENTINI, R.; LUIS, J.; KARRAY, A.; KALLECH-ZIRI, O.; SRAIRI-ABID, N.; BAZAA, A.; LORET, E.; BEZZINE, S.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N. Two purified and characterized phospholipases A<sub>2</sub> from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration. **Toxicon**, v. 53, n. 4, p. 444-453, 2009.

ZULIANI, J.P.; GUTIÉRREZ, J.M.; CASAIS E SILVA, L.L.; COCCUZZO SAMPAIO, S.; LOMONTE, B.; PEREIRA TEIXEIRA, C. F. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v. 46, n. 5, p. 523-532, 2005.

ZYCHAR, B.C.; DALE, C.S.; DEMARCHE, D.S.; GONÇALVES, L.R.C. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A<sub>2</sub> to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon**, v. 55, n. 2, p. 227-234, 2010.

## ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética na Utilização de Animais



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa  
Mônica - Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:[ceua@propp.ufu.br](mailto:ceua@propp.ufu.br);  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

### ANÁLISE FINAL Nº 028/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 108/12

Projeto Pesquisa: "Caracterização funcional, biológica e estrutural de proteases purificadas de peçonhas de serpentes brasileiras".

Pesquisador Responsável: Fábio de Oliveira

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 05 de Fevereiro de 2013

Prof. Dr. César Augusto Garcia  
Coordenador da CEUA/UFU