

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Revisão bibliográfica sobre os aspectos funcionais, estruturais e aplicações terapêuticas
de diferentes fosfolipases A₂ isoladas da peçonha de *Bothrops pauloensis***

Lívia Maria Gomes Araújo

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

ITUIUTABA-MG

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Revisão bibliográfica sobre os aspectos funcionais, estruturais e aplicações terapêuticas
de diferentes fosfolipases A₂ isoladas da peçonha de *Bothrops pauloensis***

Lívia Maria Gomes Araújo

Dr^a. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

ITUIUTABA-MG

2018

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, madrinha e avós por estarem ao meu lado e sempre acreditarem em mim.

À minha amiga/irmã Bruna por nunca ter desistido de mim e estar do meu lado nos bons e maus momentos desde a nossa infância.

Sou grata também aos amigos que fiz ao longo da minha trajetória durante a graduação e que fizeram da universidade um lugar melhor.

Às pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram e apoiaram, e aos demais amigos e familiares não citados, que se fizeram presentes e me incentivaram mesmo estando distantes.

À minha orientadora, Dr^a. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, pelos conhecimentos transmitidos, acolhimento e paciência.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e ao Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LaBiTox).

RESUMO

As fosfolipases A₂ (PLA_{2s} E.C. 3.1.1.4) são objeto de pesquisas devido à sua relação com doenças inflamatórias em humanos e acidentes por animais peçonhentos. Estas são enzimas que exibem uma relevante função no metabolismo da conformação lipídica da membrana celular e estão implicadas em variados processos como a homeostase de membranas, a aquisição de nutrientes e a geração de moléculas bioativas. As toxinas de serpentes estão sendo exploradas como modelos promissores a serem utilizados na criação de novos medicamentos. Diversos estudos já abordaram sobre suas ações farmacológicas e aplicabilidade no tratamento de patologias, demonstrando êxito. Neste trabalho foi realizada uma revisão de literatura tendo como fontes de pesquisa artigos internacionais na base de dados PubMed tendo como critério de inclusão, artigos publicados relacionados principalmente às diferentes PLA_{2s} isoladas da peçonha de *Bothrops pauloensis* (uma espécie de serpente da família *Viperidae*, abundante na Bolívia, no Paraguai e na região central do Brasil, conhecida popularmente como jararaca-pintada) até o presente momento, enfatizando suas caracterizações estruturais e funcionais, além de seu potencial terapêutico em atividades antitumorais, antiplaquetárias, antiangiogênicas, hipotensivas, antiparasitárias e microbidas.

Palavras chave: *Bothrops pauloensis*, Fosfolipase A₂, Peçonha de serpente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Fosfolipases: classes e atividades catalíticas.....	6
1.2 Fosfolipases de peçonhas de serpentes.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1. Obtenção das PLA₂s da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>.....	17
4.2. Características bioquímicas e estruturais das PLA₂s isoladas de <i>Bothrops pauloensis</i>.....	20
4.3. Características funcionais e potencial terapêutico das PLA₂s da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>.....	23
5. CONCLUSÃO.....	29
6. REFERÊNCIAS.....	30
7. NORMAS DA REVISTA TOXICON.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fosfolipases: classes e atividades catalíticas

As fosfolipases (PLs) são enzimas que participam no metabolismo de fosfolipídeos, os quais são componentes essenciais das membranas celulares e participam de sua estrutura e funcionamento. Estas enzimas estão presentes em quase todos os animais, plantas e bactérias (NIEWERTH e KORTING, 2001) e estão envolvidas em processos diversificados como: a homeostase de membranas, a aquisição de nutrientes e a geração de moléculas bioativas (KÖHLER et al, 2006). Elas hidrolisam predominantemente glicerofosfolipídeos, entretanto também podem realizar a degradação de lipídios neutros (KÖHLER et al, 2006); entre os fosfolipídios naturais, a fosfatidilcolina ou lecitina é o substrato mais comum de PLs cataliticamente ativas. Um fosfolipídio contém quatro porções ésteres, e todas elas são propensas à hidrólise enzimática de fosfolipases (DENNIS, 1983).

A classificação das mesmas é realizada de acordo com a posição em que hidrolisam o substrato, sendo distribuídas em fosfolipases A, B, C ou D (Figura 1) (KÖHLER et al, 2006; NIEWERTH e KORTING, 2001).

As PLs tipo A (PLAs) efetuam a catálise da reação para a remoção lipolítica da porção de ácido graxo esterificado ao glicerol, gerando a lisolecitina, que representa um componente tóxico existente em numerosas peçonhas de serpentes e abelhas, e que possui capacidade para destruir as membranas dos eritrócitos, ocasionando a hemólise (NIEWERTH e KORTING, 2001). Essa enzima é representada por duas isoenzimas: PLA₁ e PLA₂, que podem ser distinguidas pela determinação do lisofosfolipídeo que é formado (SMITH; SILVER; WEBSTER, 1973).

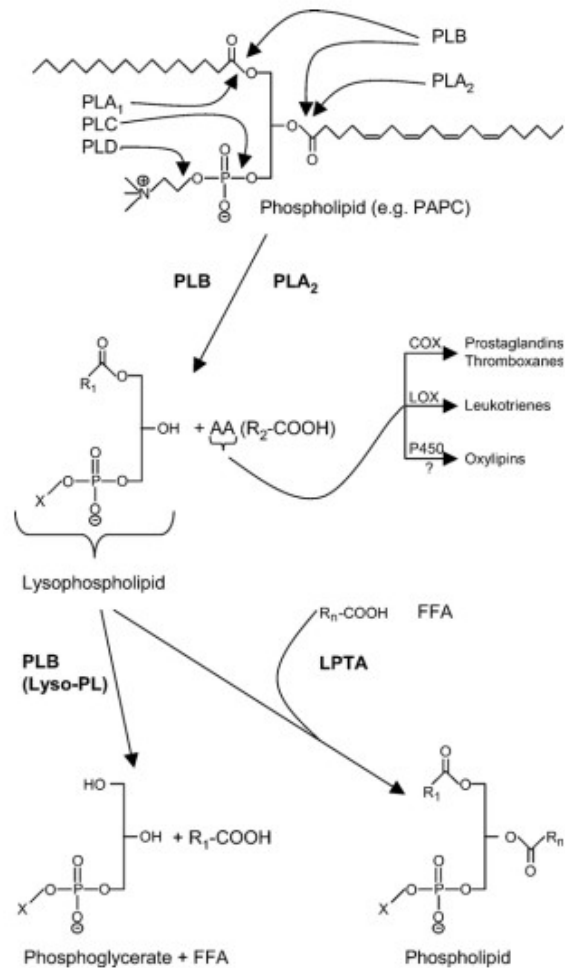


Figura 1. Sítios de hidrólise das PLs (A, B, C, D) e posições das atividades hidrolíticas de cada tipo de fosfolipase em um fosfolipídio (PAPC). As enzimas PLA₂ ou PLB formam lisofosfolipídeos cujo ácido graxo esterificado restante pode ser removido por PLBs ou outras lisofosfolipases. A atividade de lisofosfolipase/transacilase (LPTA) encontrada em PLBs pode esterificar um ácido graxo livre (FFA) a um lisofosfolipídeo gerando um fosfolipídeo. O ácido araquidônico (AA) na posição sn-2 da PAPC pode ser mobilizado pelas enzimas PLA₂ ou PLB e funcionar como um precursor para os eicosanóides que são gerados pelas atividades enzimáticas indicadas (KÖHLER et al., 2006).

A PLA₁ é uma enzima que hidrolisa a posição sn-1 as ligações ésteres dos fosfolipídeos, tendo como produto lisofosfolipídeos e ácidos graxos (INOUE; ARAI; AOKI, 2005). Em mamíferos foram descritos dois tipos de PLA₁s com sequências distintas de aminoácidos, classificadas em intra e extracelular. O tipo I extracelular é composto por PLA₁

específica de fosfatidilserina (PS-PLA₁), forma curta de fosfolipase A₁ específica de fosfatidilserina (PS-PLA₁ ΔC), fosfolipase seletiva de ácido fosfatídico associada à membrana A₁α (mPA-PLA₁α), e fosfolipase A₁β seletiva de ácido fosfatídico associada à membrana (mPA-PLA₁β), enquanto o tipo II intracelular é constituída por ácido fosfatídico que prefere a fosfolipase A₁ (PA-PLA₁), proteína KIAA0725 e p125 (INOUE; ARAI; AOKI, 2005).

Nas plantas, as PLAs são classificadas por analogia da sequência e funções biológicas, nas classes: PLA₁ hidrolisante de PC (PC-PLA₁), PLA₁ específica de PA (PA-PLA₁), PLA₂ secretada de baixo peso molecular (sPLA₂) e PLA como patatina (pPLA) (WANG et al., 2012).

A PLA₂ foi a primeira fosfolipase a ser identificada; sua descoberta fundamentou-se na análise da hidrólise de fosfatidilcolina pelo suco pancreático e pela peçonha de serpente (WITTCOFF, 1951). As PLA₂s compõem uma família de enzimas que clivam glicerofosfolipídeos, rompendo a membrana através da hidrólise dependente de Ca²⁺ na ligação éster sn-2, criando lisofosfolipídeos e liberando ácidos graxos; fundamentais em numerosos processos biológicos, incluindo a geração de mediadores lipídicos pró-inflamatórios, tais como prostaglandinas e leucotrienos, e a regulação do metabolismo lipídico (GLASER, 1995; SANTOS et al., 2010; KUDO; MURAKAMI, 2002;).

A superfamília de PLA₂s consiste em 16 grupos e seus subgrupos que, de acordo com a exigência de Ca²⁺, origem, mecanismo catalítico, suas características funcionais, sequenciais e estruturais como peso molecular e padrões de ligação dissulfureto, podem ser classificados em uma das seis categorias mais importantes (BURKE; DENNIS, 2008a; DENNIS et al., 2011): PLA₂s secretadas (sPLA₂), PLA₂s citosólicas (cPLA₂), PLA₂s independentes de Ca²⁺ (iPLA₂), acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH), PLA₂s lisossomais (LPLA₂) (SCHALOSKE e DENNIS, 2006), e PLA₂ tecido adiposo específica (AdPLA₂) (DUNCAN et al., 2008).

As cPLA₂ hidrolisam principalmente glicerofosfolipídeos com ácido araquidônico na posição sn-2, seu sítio catalítico apresenta resíduos de serina e aspartato, possuem ação catalítica dependente de Ca²⁺ e sua massa molecular pode variar entre 61 a 114 kDa (BURKE; DENNIS, 2008b). O grupo teve seu isolamento, determinação sequencial e clonagem executados com base na linhagem de células U973, e pode ser encontrado em diversas células como eritrócitos, macrófagos e células do rim (CLARK; MILONA; KNOPF, 1990; CLARK et al., 1991; KRAMER et al., 1996; SHARP et al., 1991).

As LPLA₂s foram isoladas a partir de cérebro bovino e esterificam um grupo acil com um grupo hidroxil na posição C-1 de ceramidas, onde os fosfolipídeos atuam funcionalmente como doadores de radicais acil (ABE e SHAYAMAN, 1998). São assim chamadas por estarem localizadas próximo à β-hexosaminidase (HIRAOKA; ABE; SHAYMAN, 2002). Estas enzimas apresentam uma tríade conservada dos resíduos de serina, histidina e aspartato e quatro resíduos de cisteína, que são fundamentais para a catálise (BURKE; DENNIS, 2008b).

As PLA₂s independentes de Ca²⁺ (iPLA₂) estão envolvidas no remodelamento de fosfolipídeos, clivando um fosfolipídeo para gerar 2 lisofosfolipídeos que, reacilados com ácidos graxos geram novos fosfolipídeos (BALSINDE; DENNIS, 1996). Estas possuem massas moleculares de 28 a 146 kDa, apresentando um resíduo de serina em seu sítio catalítico (BURKE; DENNIS, 2008b). A primeira iPLA₂ a ser clonada e que teve suas características definidas, foi isolada de macrófagos P388D1 (ACKERMANN et al., 1994). Os macrófagos utilizam o ácido araquidônico dos fosfolipídeos de membrana, e esse processo necessita do envolvimento das fosfolipases (BALSINDE et al., 1994). Ainda que a ação de iPLA₂ não dependa de Ca²⁺, sua atividade catalítica é moderada pela quantidade de Ca²⁺ em reservas localizadas no interior das células ou pela proteína calmodulina dependente de cálcio (WOLF et al., 1997).

As Acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH) realizam a hidrólise de grupos acetil da posição sn-2 de fatores ativadores de plaquetas (SCHALOSKE; DENIS, 2006), e podem ser encontradas com abundância em mamíferos, em locais como sistema nervoso central e em eritrócitos (BURKE; DENNIS, 2008b). As PLA₂ tecido adiposo específicas (AdPLA₂) são expressas no tecido adiposo e catalisam a amplificação de ácidos graxos livres e lisofosfolídeos a partir da fosfatidilcolina, realizando a hidrólise preferencialmente na posição sn-2 de fosfolídeos, cuja atividade no metabolismo adipogênico é relevante para o mesmo (DUNCAN et al., 2008).

As PLA₂s secretadas (sPLA₂) são as mais bem caracterizadas do grupo e estão envolvidas em uma variedade de atividades biológicas como digestão, inflamação, geração de mediadores de lipídeos, multiplicação celular, exocitose, ação microbicida, entre outras. Em conformidade com a quantidade de resíduos de aminoácidos e posição das ligações dissulfeto, elas são distribuídas em diferentes grupos como: IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XIIA, XIIB, XIII e XIV (BURKE; DENNIS, 2008a; DENNIS et al., 2011). A maioria desses grupos de enzimas apresentam ativação interfacial (BURKE; DENNIS, 2008a).

As fosfolipases A₂ secretadas são definidas pela sua baixa massa molecular variando de 13 a 18 kDa, presença de histidina no sítio ativo, requerem Ca²⁺ para catálise, a presença de seis ligações dissulfeto conservadas, e manifestação de uma ou duas pontes dissulfeto adicionais variáveis (SCHALOSKE; DENNIS, 2006; SIX; DENNIS, 2000). Essas enzimas são estocadas em grânulos citoplasmáticos, e são secretadas para o meio extracelular quando ocorre a estimulação (AKIBA; SATO, 2004).

As distintas formas de sPLA₂s já exploradas (podem ser encontradas em répteis e mamíferos, artrópodes, moluscos, plantas e bactérias, com diferentes distribuições nos tecidos (SIX; DENNIS, 2000). As sPLA₂s encontradas em peçonhas de serpentes são separadas em dois grupos: IA, enzimas identificadas nas peçonhas das serpentes pertencentes às famílias

Elapidae e *Hydrophiidae*, enquanto as do grupo IIA, famílias *Crotalidae* e *Viperidae* (WARD et al., 2001).

Dentre as subdivisões do grupo IIA, as principais são PLA₂s Asp49, que são enzimas cataliticamente ativas, apresentando um resíduo de aspartato na posição 49, e PLA₂s Lys49, cataliticamente inativas ou com pouca atividade, cujo resíduo da posição 49 é substituído por uma lisina (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997; OWNBY et al., 1999; SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004). As PLA₂s Asp 49 ainda podem ter caráter básico ou ácido, com pontos isoelétricos entre 7,0 e 10,0 (DAMICO et al., 2005; CALGAROTTO et al., 2008; VINDAS et al., 2018), ou 4,0 a 6,0 (FULY et al., 2002; MODESTO et al., 2006; SOBRINHO et al., 2018), respectivamente. As distinções das propriedades enzimáticas proteicas das sPLA₂s pertencentes ao grupo II são definidas principalmente pelo resíduo localizado na posição 49 (RODRIGUES, 2006). O arranjo das cadeias laterais de ácido graxo propõe uma via de acesso comum do substrato, desde sua posição no agregado lipídico até sua interação com o sítio ativo no mecanismo de ação. A ligação ótima e a catálise na interface lipídio-água ocorrem devido à difusão facilitada do substrato da superfície de ligação interfacial ao sítio catalítico que possui em sua forma ativa um íon cálcio, que é coordenado pela carboxila da cadeia lateral de um resíduo de Asp na posição 49, mais duas moléculas de água estrutural, além dos átomos de oxigênio do carboxilato dos resíduos de aminoácidos presentes nas posições 28 e 30 e 32 (SCOTT et al., 1990). A substituição do aspartato de aminoácido por uma lisina provoca a perda da atividade enzimática destas PLA₂s por não interagirem com o cálcio do sítio ativo, (LOMONTE; ANGULO; SANTAMARÍA, 2003), porém, as Lys49-PLA₂s podem perturbar a integridade das membranas e induzir efeitos farmacológicos (DÍAZ et al., 1991; RUFINI et al., 1992; LOMONTE; ANGULO; SANTAMARÍA, 2003; LOMONTE; RANGEL, 2012).

As fosfolipases B (PLBs) são enzimas que realizam a clivagem das ligações sn-1 e sn-2 de glicerofosfolipídeos. Encontram-se na parede celular das leveduras e é responsável por

facilitar a lise celular e liberação de lipídeos como segundos mensageiros através de uma hidrólise dos fosfolipídeos, onde quando fagocitada, essa enzima leva a ruptura do fagolisossomo (KRONSTAD et al., 2011; ALMEIDA et al., 2015). É descrita para essas enzimas atividade tipo fosfolipase transacilase em fungos (CHEN et al., 2000), sendo consideradas fatores de virulência para organismos patogênicos (SHEN et al., 2004). Logo, estas enzimas apresentam três tipos de atividades enzimáticas, mas ainda não se sabe qual a mais importante para sua ação patogênica (GANENDREN et al., 2006). Além de ser encontrada nos fungos, as fosfolipases B também já foram descritas em uma variedade de peçonhas de serpentes e peçonha de abelha (DOERY e PEARSON, 1964), e em tecidos de mamíferos (NOGUCHI, 1944; SHAPIRO, 1953; DAWSON, 1956; MARPLES e THOMPSON, 1960). E através de estudos realizados por Contardi e Ercoli (1933) com o farelo de arroz, esses pesquisadores reconheceram a PLB como uma enzima específica que não agia sobre a lecitina até que um ácido graxo fosse removido pela fosfolipase A.

As fosfolipases C (PLC) são enzimas intracelulares e ativadas por cascata de sinalização hormonal. Estas catalisam a hidrólise de fosfotidil-inositol-4,5-difosfato (PiP₂), tendo como produtos dessa reação o diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (ITP/IP₃). É um fator comum a fosfolipase C e outras proteínas a regulação sobre a atividade de uma proteína-quinase, uma vez que o diacilglicerol produzido pela PLC é um ativador de proteínas-quinases, fosforilando algumas proteínas específicas na membrana plasmática e no citoplasma, e assim, as ativando. Um dos exemplos clássicos desencadeados pela PLC é o controle da contração muscular e da vasoconstrição, uma vez que um dos produtos de sua catálise (IP₃) leva a liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático para que forme um complexo cálcio-calmodulina, que irá levar a fosforilação da miosina por uma proteína quinase. Haverá então associação com actina, levando a contração (GONZALEZ e CERONI, 2006).

Finalmente, as fosfolipases D (PLDs) são enzimas capazes de liberarem a colina da fosfatidilcolina para catalisar a formação do ácido fosfatídico, aumentando a composição lipídica ácida da membrana celular (NIEWERTH e KORTING, 2001; SELVY et al., 2011). Essas enzimas pertencem ao grupo das fosfolipases ubíquas na natureza e são encontradas em uma ampla diversidade de organismos, desde vírus, bactérias, leveduras, plantas e animais (JENKINS e FROHMAN, 2005). Em mamíferos, duas isoformas de PLD, PLD₁ e PLD₂, estão localizadas na membrana plasmática e em membranas intracelulares, incluindo a do retículo endoplasmático (FREYBERG et al., 2001; FREYBERG; BOURGOIN; SHIELDS, 2002), na maioria dos tipos celulares desses animais a atividade enzimática é relatada, com exceção de leucócitos e algumas linhagens de linfócitos (JENKINS e FROHMAN, 2005). Ambas as isoformas de PLD desempenham funções cruciais na regulação de processos celulares como autofagia e apoptose, apresentando potencial para utilização na terapia do câncer (NAKAGAWA et al., 2017).

1.2. Fosfolipases de peçonhas de serpentes

As peçonhas de serpentes demonstram um amplo espectro de atividades biológicas (JAIN e KUMAR, 2012) e consistem em uma complexa mistura de compostos orgânicos e inorgânicos, dentre eles enzimas com ou sem atividade catalítica, como fosfolipases A₂ (PLA₂), metaloproteases, serinoproteases, hialuronidases, L-aminoácidos oxidases (AALO), acetilcolinesterases, fatores de crescimento, ativadores de proteína C, lectinas, peptídeos compreendendo principalmente potenciadores da bradicinina e desintegrinas, assim como inibidores enzimáticos (RAMOS, 2005). Estes compostos vêm sendo descritos por terem um grande potencial para síntese de novos compostos farmacológicos para o tratamento de diversas enfermidades, como câncer, artrite, trombose, esclerose múltipla, dor, distúrbios

neuromusculares, doenças sanguíneas e cardiovasculares, infecções e doenças inflamatórias (VONK et al., 2011; CALDERON et al., 2014; PAL et al., 2002).

As PLA₂s são proteínas bastante abundantes na peçonha das serpentes da família *Viperidae* (ZOUARI-KESSENTINI et al., 2013), e já demonstraram uma variedade de atividades, incluindo neurotoxicidade, miotoxicidade, atividade hemolítica, antibacteriana, anticoagulante e antiplaquetária; algumas PLA₂s de peçonhas já foram descritas com atividades antitumorais e antiangiogênicas por mecanismos independentes de sua atividade enzimática (ZOUARI-KESSENTINI et al., 2013; LOMONTE et al., 2010; AZEVEDO, et al., 2016). Em uma única peçonha pode haver várias classes de PLA₂, e estas isoenzimas podem diferir amplamente nas características físicas, químicas, enzimáticas e farmacológicas.

Desde a descoberta da espécie *B. pauloensis* houveram alterações em sua nomenclatura, que primariamente foi descrita por Amaral (1925) como *Bothrops neuwiedi pauloensis*, entretanto, revisões sistemáticas de SILVA (2004) consideraram *B. n. Pauloensis* uma espécie distinta. Futuramente, Fenwick e colaboradores 2009 categorizaram o gênero *Bothrops* como *Bothropoides*, mas a taxonomia tradicional (*Bothrops*) permaneceu com base em dados morfológicos, ecológicos e moleculares (MACHADO; SILVA; SILVA, 2014; CARRASCO et al., 2012). De acordo com pesquisas realizadas por Rodrigues e colaboradores (2012), utilizando o transcriptoma da glândula e o proteoma da peçonha de *B. pauloensis*, há uma enorme variedade de compostos bioativos em sua composição, onde as metaloproteinases, PLA₂s e potenciadores de bradicinina representam as principais classes de toxinas.

O envenenamento ofídico é considerado um grande problema de saúde pública (GUTIERREZ et al., 2010), e seu quadro clínico é causado por diferentes enzimas presentes em peçonhas. A intoxicação humana por essa espécie de serpente apresenta sintomas verificados na maioria dos acidentes botrópicos, como: formação de edema, dor, equimose,

hemorragia, inflamação, necrose epidérmica, necrose muscular no local da picada, hemólise sistêmica, perturbações da coagulação e choque hipotensivo (NISHIOKA; SILVEIRA, 1992; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995).

A implicação desses compostos em diversos processos fisiopatológicos levou a um avanço na busca por inibidores de origem natural ou artificial, para a neutralização das PLA₂s, além de maior compreensão sobre seu mecanismo de ação. As toxinas encontradas em peçonhas podem ser identificadas e inibidas por anticorpos poli ou monoclonais, e outros agentes como produtos químicos e compostos animais e vegetais (BORGES et al., 2000; BORGES et al., 2001; STÁBELI et al., 2005). As serpentes e alguns mamíferos apresentam resistência a envenenamentos por peçonha de serpentes (OMORI-SATOH et al., 1972; OVADIA; KOCHVA, 1977), possuindo proteínas inibitórias da PLA₂, no plasma sanguíneo para a proteção contra as toxinas e seus efeitos prejudiciais (FAURE, 2000; FORTES-DIAS, 2002). Esses inibidores isolados do plasma ou soro de serpentes são proteínas oligoméricas ácidas com massa molecular de 18 a 75 kDa, compostas por 3-6 subunidades de 20-50 kDa, unidas por ligações não covalentes (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003), e são classificados em tipos α , β e γ , devido a características estruturais (THWIN et al., 2002).

A peçonha da espécie *B. pauloensis* é uma grande fonte de PLA₂s (RODRIGUES et al., 2012). Cerca de 26-32% da peçonha total é representado por PLA₂s, sendo que destes 16,4% são PLA₂s Lys 49 e 15,9% são PLA₂s Asp49. Muitas dessas PLA₂s já foram isoladas e suas propriedades estruturais e funcionais descritas (RODRIGUES et al. 1998; RODRIGUES et al. 2004; RODRIGUES et al.; 2007; FERREIRA et al., 2011. Dessa forma, o presente estudo teve como intuito realizar uma revisão bibliográfica sobre os principais aspectos estruturais e funcionais das PLA₂s já isoladas da peçonha de *B. pauloensis* correlacionando-os com outros estudos de PLA₂s de peçonhas ofídicas. Neste aspecto, o presente trabalho traz uma abordagem relevante por trazer conjuntamente informações acerca dessas proteínas, podendo auxiliar

novas pesquisas nesta área que visam o entendimento do mecanismo de ação de tais proteínas presentes nas peçonhas animais, bem como estudos que buscam novos modelos farmacológicos de origem natural em benefício do tratamento e diagnóstico de diferentes patologias.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo a elaboração de uma revisão de literatura sobre os aspectos funcionais, estruturais e aplicações terapêuticas de diferentes PLA₂s isoladas da peçonha de *B. pauloensis*.

2.1.1 Objetivos específicos

Realizar uma descrição dos principais aspectos relacionadas ao isolamento, a estrutura, função e potencial terapêutico das PLA₂s BnSP6, BnSP7, BnpTX1, BnpTXII, BpPLA₂ e BpPLA₂TX1 isoladas da peçonha de *B. pauloensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia escolhida foi a de revisão de literatura, e os artigos científicos foram coletados em buscas em bases de dados como PubMed, além de teses de doutorado e dissertações de mestrado encontradas no acervo da biblioteca da Universidade Federal de Uberlândia. A elaboração deste estudo implicou em leitura da bibliografia e análise das informações obtidas que passaram a fazer parte da composição do trabalho.

A busca bibliográfica foi realizada no período de março a junho de 2018, onde foram identificados e utilizados para o estudo aproximadamente 140 trabalhos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção das PLA₂s da peçonha de *Bothrops pauloensis*

Da peçonha de *B. pauloensis* foram isoladas até o momento quatro PLA₂s básicas denominadas de BnSP-6 e BnSP-7 (RODRIGUES et al., 1998); BnpTX-I e BnpTX-II (RODRIGUES et al., 2004); e duas PLA₂s ácidas denominadas de BpPLA₂ (RODRIGUES et al., 2007) e BpPLA₂TX1 (FERREIRA et al., 2011). Usualmente, todas as isoformas isoladas de *B. pauloensis* de caráter básico e ácido até o presente momento foram obtidas com a utilização de diferentes processos cromatográficos (Figura 2), e a homogeneidade das enzimas foi confirmada por eletroforese em géis de poliacrilamida e cromatografias de alta performance em fase reversa (HPLC-RP).

As PLA₂s básicas apresentam um conteúdo maior de resíduos de aminoácidos básicos, possuindo pIs mais elevados facilitando assim a utilização de colunas cromatográficas trocadoras catiônicas como a CM-Sepharose para os processos iniciais de purificação. Estas enzimas ligam-se fortemente aos grupos aniônicos (carboxi-metil) dessas resinas cromatográficas, sendo posteriormente eluídas pelo aumento da força iônica do tampão eluente (SOARES et al., 1998; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; SOARES et al., 2001; SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004).

As PLA₂s BnSP-6 e da BnSP-7 foram as primeiras enzimas a serem isoladas da peçonha de *B. pauloensis*. A metodologia para sua obtenção foi descrita por Rodrigues et al. 1998 e Soares et al. (2000b), onde inicialmente a peçonha bruta de *B. pauloensis* foi ressuspendida em tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 8,0 e a mistura foi então centrifugada e o sobrenadante foi aplicado a uma coluna de CM-Sepharose equilibrada com o mesmo tampão. As PLA₂s (BnSP-6) e (BnSP-7) foram eluídas da coluna utilizando um

gradiente convexo de concentração molar utilizando o tampão bicarbonato de amônio 0,05 M a 0,5 M pH 8,0. Estas PLA₂s foram purificadas da peçonha bruta utilizando apenas uma etapa cromatográfica. As PLA₂s básicas BnpTX-I e II foram também obtidas pelo mesmo processo descrito anteriormente utilizando a cromatografia em CM-Sepharose (RODRIGUES et al., 2004), porém necessitaram de mais duas etapas sequenciais de purificação em cromatografias de gel filtração (Sephadex G-50) e fase reversa (HPLC-RP).

Os procedimentos utilizados para o isolamento de PLA₂s básicas frequentemente contêm uma etapa cromatográfica de troca catiônica, para separá-las dos componentes ácidos da peçonha, pois geralmente essas enzimas miotóxicas são os últimos componentes a serem eluídos a partir de colunas de permuta catiônica, utilizando gradientes de sal e pH neutro (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995). Moura da Silva e colaboradores (1991) isolaram PLA₂s de peçonhas de diferentes espécies de *Bothrops* utilizando um sistema FPLC por cromatografia de permuta catiônica. As amostras foram aplicadas à coluna mono S-HR S/5 equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 e as proteínas ligadas à coluna foram eluídas com um gradiente linear de cloreto de sódio (0 a 1 M) no mesmo tampão. Wu e Tinker (1969) purificaram a PLA₂ da peçonha de *Crotalus atrox* usando fracionamento com sulfato de amônio seguido por cromatografia em coluna Sephadex G-75.

Calgarotto e colaboradores (2008) isolaram a BmTX-I da peçonha de *Bothrops moojeni* com apenas um passo cromatográfico utilizando HPLC de fase reversa na coluna μ -Bondapak C-18. Kasturi e Gowda (1989) purificaram VRV PL-VIIIa, uma PLA₂ básica a partir da peçonha de *Vipera russelli* por cromatografia em coluna CM-Sephadex C-25 seguida de filtração em gel em Sephadex G-50. O processo de cromatografia em coluna CM-Sephadex C25 também pode ser utilizado para a purificação de enzimas de serpentes de diferentes gêneros, como foi usado por pesquisadores como Bhat e Gowda (1989), que isolaram NN-XIII-PLA₂ da peçonha da serpente indiana *Naja naja naja*.

As duas PLA₂s ácidas isoladas da peçonha de *B. pauloensis* foram denominadas de BpPLA₂ (RODRIGUES et al., 2006) e BpPLA₂-TXI (FERREIRA, 2011). A BpPLA₂ foi obtida após três passos cromatográficos em troca-iônica (CM-Sepharose), interação hidrofóbica (Phenyl-Sepharose) e fase reversa em coluna C18 (HPLC-RP). Já a BpPLA₂-TXI foi isolada após o fracionamento da peçonha bruta de *B. pauloensis* em CM-Sepharose, sendo que o pico que apresentou atividade fosfolipásica A₂ foi posteriormente aplicado a uma coluna de gel filtração em Sephacryl-S300 HR HiPrep 26/60, a qual resultou em sete novas frações proteicas, denominadas S1-S7. A fração S4, que exibiu alta atividade de PLA₂, foi aplicada em uma coluna de troca aniônica Hi-Trap Q FF, resultando em dois picos, Q1 e Q2. A fração Q2 ativa foi aplicada em cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC) C2-C18 μ RPC, resultando na purificação da BpPLA₂-TXI.

As metodologias empregadas em diferentes estudos já publicados para o isolamento de PLA₂s ácidas de peçonhas de serpentes do mesmo ou de outros gêneros podem apresentar dois ou mais passos, porém são procedimentos semelhantes, mas com algumas modificações como o tipo de tampão utilizado e o pH. As mesmas possuem etapas em comum com a purificação das fosfolipases de *B. pauloensis* como o uso da cromatografia em fase reversa (HPLC). Como descrito por Denegri e colaboradores (2010), para a purificação da proteína ácida Ba SpII RP4 a partir da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* são utilizadas duas etapas cromatográficas: uma filtração em gel convencional em Sephadex G-75 e fase reversa em coluna C18 HPLC. A fração Ba SpII, que apresentou alta atividade fosfolipásica foi fracionada em coluna cromatográfica de fase reversa HPLC e as frações cataliticamente ativas resultantes foram reunidas, liofilizadas e armazenadas. O tampão utilizado no procedimento foi bicarbonato de amônio 1M e pH 8,0. A homogeneidade desta PLA₂ foi demonstrada por SDS-PAGE. Para o isolamento de uma PLA₂ ácida da peçonha de *B. asper*, o primeiro passo cromatográfico foi realizado em CM Sephadex em pH 7,0.

Posteriormente passou-se por DEAE-Sepharose, onde a maior atividade de PLA₂ eluiu na fração D1. A subsequente separação por RP-HPLC desta fração eliminou a maioria dos contaminantes, e o restante foi removido por um passo final de fracionamento em CM-Sephadex a pH 5,0 (FERNÁNDEZ et al., 2010). Araújo, Radvanyi e Bon (1994) purificaram uma PLA₂ ácida da peçonha de *Bothrops lanceolatus* utilizando a filtração em gel de Sephadex G-50 e cromatografia de troca iônica em CM-celulose. Saikia, Thakur e Mukherjee (2011) isolaram a RVVA-PLA₂-I a partir da peçonha de *Daboia russelli*. Inicialmente foi utilizada a resina CM Sephadex C-50, depois as frações ativas foram fracionadas através de um trocador aniônico DEAE Sephadex A-50. Um dos picos resultantes (V) foi eluído e em seguida fracionado através de coluna de filtração em gel e separado em três frações. A fração GFI foi ainda purificada utilizando RP-HPLC.

4.2. Características bioquímicas e estruturais das PLA₂s isoladas de *Bothrops pauloensis*

As PLA₂s Lys49 básicas BnSP-6 e BnSP-7 isoladas da peçonha de *B. pauloensis* apresentam pI de 8,6 e 8,8, respectivamente (RODRIGUES et al., 1998). A proteína BnSP-6 é constituída apenas de uma única cadeia polipeptídica com *Mr* (13,4 kDa), Azevedo e colaboradores (2016) realizaram o sequenciamento de trinta e quatro resíduos de aminoácidos da região N-terminal da mesma. A estrutura primária da proteína BnSP-7 revelou uma sequência amino terminal altamente conservada e homóloga às miotoxinas Lys-49 de outras peçonhas botrópicas (RODRIGUES et al., 1998), além disso, sua massa molecular é semelhante a de BnSP-6, variando em torno de 13,5 e 14,0 kDa (OLIVEIRA et al., 2007). A BnSP-6 e BnSP-7 foram as únicas PLA₂s de *B. pauloensis* que tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas (Figura 2) (MAGRO et al., 2003). Neste estudo foi demonstrado que estas BnSP-6 e BnSP-7 possuem sete pontes dissulfetos e formam dímeros, além de possuírem um alto

conteúdo de resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos. O N-terminal destas proteínas contém um resíduo de serina e resíduos de Gly30, Gly33, His48, Asp 99 conservados em sua estrutura (MAGRO et al., 2003).

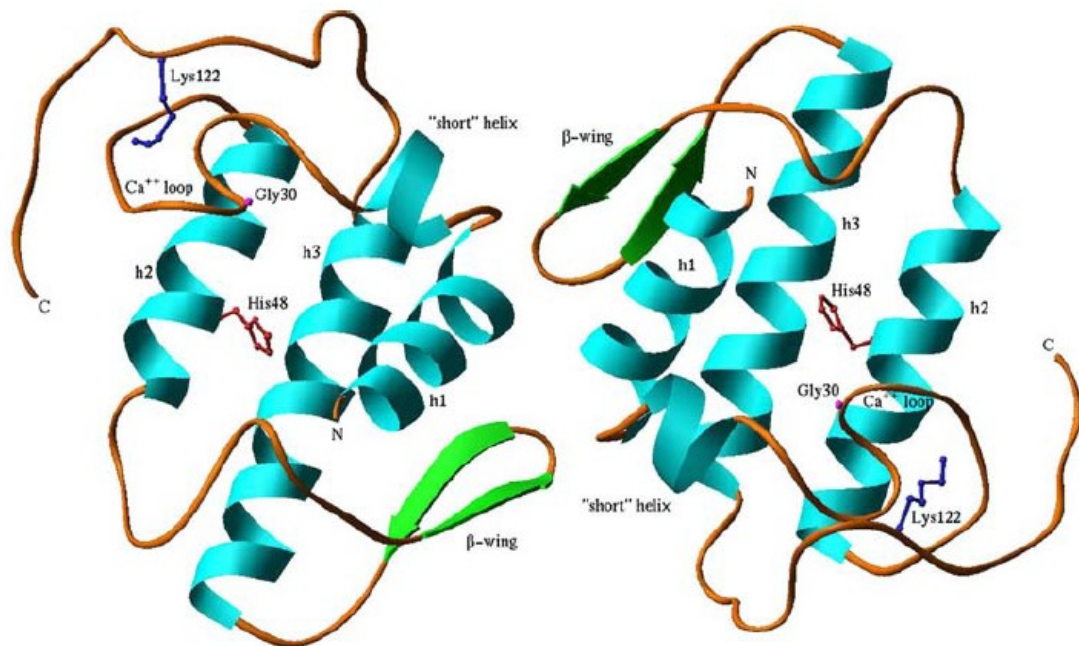


Figura 2. Diagrama de fita demonstrando a estrutura de BnSP-7. A BnSP-7 é dimérica, apresentando estrutura basicamente idêntica a outras estruturas miotóxicas Lys49-PLA₂s, possuindo sete pontes dissulfeto e os principais elementos estruturais secundários conservados. A estrutura é composta por: alfa-hélice 1 N-terminal, alça de ligação de Ca²⁺, duas α -hélices anti-paralelas 2 e 3, folha β anti-paralela curta de dois filamentos (β -asa), e loop C-terminal. (MAGRO et al., 2003).

As demais PLA₂s básicas isoladas de *B. pauloensis* (BnpTXI e II) apresentaram um *Mr* em torno de 14.000 para o monômero e 28.000 para o dímero, pI 7.8, cerca de 121 resíduos de aminoácidos e sete ligações dissulfeto. As sequências N-terminais de ambas revelaram analogia com miotoxinas Asp49 básicas de outras peçonhas de serpentes, possuindo em média 70% de similaridade (RODRIGUES et al., 2004). A análise da estrutura primária da BnpTX-I por Rodrigues e colaboradores (2004) mostrou que esta enzima contém todos os resíduos conservados da PLA₂ implicados na ligação ao Ca²⁺ (Tyr28, Gly30, Gly32 e Asp49) e na rede

catalítica (His48). Foram observadas substituições no canal hidrofóbico onde o Trp19, relatado como membro da superfície de ligação interfacial (SCOTT et al., 1990), é substituído por um resíduo Phe19. A BnpTX-II não foi sequenciada até seu 49º resíduo de aminoácido, mas sua atividade catalítica, homologia de sequência e antigenicidade sugerem que é uma Asp49 PLA₂ (RODRIGUES et al., 2004).

As PLA₂s Asp-49 ou Lys 49 básicas apresentam um grande conteúdo de resíduos de lisina (FULY et al., 2000). Muitas pesquisas têm mostrado que a região C-terminal dessas proteínas, inclui um segmento contendo os resíduos 115-129, este é responsável pela miotoxicidade das Lys49-PLA₂s, devido à combinação de resíduos carregados positivamente e resíduos hidrofóbicos (NÚÑEZ, ANGULO e LOMONTE, 2001; CHIOATO et al., 2007), e que esta ação está diretamente ligada com a forma dimérica das PLA₂-Lys49 em solução (FRANCIS et al., 1991; DA SILVA GIOTTO et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2001). A MjTX-I, isolada por Soares e colaboradores (2000a) a partir da peçonha de *Bothrops moojeni* apresentou peso molecular estimado de 13.400, pI 8,2 e 121 aminoácidos, com alta proporção de resíduos básicos e hidrofóbicos. Outra proteína isolada da mesma espécie por Calgarotto e colaboradores (2008), a BmTX-I, apresenta uma massa molecular de 14238,71 Da, pI 7,84, e também apresentou sequência de 121 resíduos de aminoácidos, 14 resíduos de semi-cisteína, e alto grau de homologia com miotoxinas Asp49 PLA₂ básicas de outras peçonhas de *Bothrops*.

A PLA₂ Asp-49 ácida BpPLA₂ da peçonha de *B. pauloensis* apresenta uma massa molecular de 15,8 kDa e ponto isoelétrico de 4,34. A análise de sua sequência N-terminal também apontou uma equivalência com as Asp49 ácidas isoladas de peçonhas ofídicas nos quinze primeiros aminoácidos: Asn-Leu-Val-Gln-Phe-Lys-Thr-Leu-Ile-Met-Lys-Ile-Ala-Gly-Arg (RODRIGUES, 2006). Esta PLA₂ possui o resíduo Asp na posição 49, sendo considerada uma Asp49 PLA₂. Análises de sua região N-terminal mostraram que ela contém resíduos de

aminoácidos conservados envolvidos no domínio de ligação do cálcio e no sítio catalítico (Tyr28, Gly30, Gly32, His48 e Asp49). A outra PLA₂ ácida da peçonha de BpPLA₂-TXI também teve sua estrutura primária elucidada a partir do sequenciamento de seu cDNA, o qual é formado por 417 pares de bases que codificam uma proteína de 122 resíduos de aminoácidos com o resíduo de aspartato na posição 49 (FERREIRA, 2011).

Os principais aspectos estruturais das PLA₂s ácidas como massa molecular, pI e aminoácidos presentes em suas sequências são similares. A enzima Ba SpII RP4 de *Bothrops alternatus* contém massa molecular de 14185,48 Da, pI de 4,88, conformação homodimérica, é composta por 121 resíduos de aminoácidos, e o alinhamento dos mesmos com aminoácidos de outras PLA₂s de *Bothrops* revelaram um alto grau de homologia na sequência (DENEGRÍ et al., 2010). A sequência amino terminal de LM-PLA₂, isolada de *Lachesis muta* possui um resíduo de ácido aspártico localizado na posição 49, com aminoácidos conservados presentes nas fosfolipases Asp-49, tais como Tyr-28, Gly-30, Gly-32, His-48 (FULY et al., 2000). Chen e Chen (1989) isolaram uma PLA₂ da peçonha de *Agkistrodon acutus*, cujo peso molecular aproximado era de 16.400, ponto isoelétrico de 4.9 e apresenta os dez resíduos de aminoácidos N-terminal homólogos aos das fosfolipases A₂ ácidas de outras peçonhas crotálicas. A BaspPLA₂-II, purificada de *Bothrops asper* é monomérica, apresentando uma massa de 14.212 Da, pI de 4.9, e sequência de 124 aminoácidos, indicando que pertence às enzimas cataliticamente ativas Asp49, e suas características toxicológicas sugerem que sua finalidade pode estar restrita às funções digestivas (FERNÁNDEZ et al., 2010).

4.3 Características funcionais e potencial terapêutico das PLA₂s da peçonha de *Bothrops pauloensis*

Há mais de cinquenta anos estudos envolvendo o isolamento e a caracterização estrutural e funcional de PLA₂s de serpentes vêm sendo realizados (SAITO; HANAHAN, 1962; RUSSELL, 1967; BHAT; GOWDA, 1989; CHEN; CHEN, 1989; OWNBY; ANGULO et al., 1997; COLBERG; WHITE, 1997; SERRANO et al., 1999; FULY et al., 2002; KETELHUT et al., 2003; NÚÑEZ et al., 2004; PONCE-SOTO et al., 2007; CALGAROTTO et al., 2008; DIZ FILHO et al., 2009; NUNES et al., 2011). Vários autores ainda dedicam seus esforços no sentido de elucidar o mecanismo de ação das fosfolipases A₂ isoladas de peçonhas ofídicas e a verificação de seus potenciais terapêuticos.

Estas enzimas são responsáveis por uma variedade de efeitos tóxicos e farmacológicos. Dentre seus efeitos mais comuns destacam-se a miotoxicidade, edema, indução ou inibição da agregação plaquetária, neurotoxicidade, efeito hipotensor, bactericida e citotoxicidade (FRANCISCHETTI et al., 1998; KINI, 2003; MASUDA et al., 2005; STÁBELI et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007; SANTOS-FILHO et al., 2008; FERNÁNDEZ et al., 2010).

As atividades funcionais da PLA₂ BnSP-7 foram amplamente estudadas. Esta proteína é capaz de induzir lesão tecidual local, sendo caracterizada por induzir edema, necrose, resposta inflamatória e lesão neuromuscular em camundongos (OLIVEIRA et al., 2009, OLIVEIRA et al., 2007). Oliveira e colaboradores (2007) verificaram que as lesões teciduais em músculos gastrocnêmios (necrose e edema) induzidas pela BnSP-7 após 24h de inoculação da toxina foram parcialmente regeneradas após 72h e 2 semanas. A literatura tem demonstrado que a atividade pro-inflamatória de PLA₂s promovendo o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o tecido injuriado, pode também contribuir para o processo de regeneração tecidual (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003). Assim, pode-se cogitar a possibilidade de que estas proteínas inicialmente induzem a lesão tecidual, porém dão início ao processo regenerativo das fibras musculares, ativando as células satélites que são precursoras das células musculares

regeneradas (HARRIS, 2003). Estes são dados que possibilitam futuramente tratamentos para processos de regeneração que se encontram defasados em algumas condições clínicas.

A PLA₂ BnSP-7 também apresentou atividade antimicrobiana por suprimir o crescimento de *Escherichia coli* (SOARES et al., 2000b), induziu efeito antiparasitário induzindo citotoxicidade contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, e apresentou efeitos sobre as formas amastigotas, diminuindo a viabilidade do parasita e retardando o processo de diferenciação de amastigota em promastigota (NUNES et al., 2013). Esta proteína também foi capaz de diminuir a adesão e proliferação de formas infectantes de *Toxoplasma gondii*, por meio da modulação de citocinas pro-inflamatórias MIF e IL-6 pelas células hospedeiras (BORGES et al., 2016). Os autores sugeriram que a BnSP-7 pode ser uma ferramenta importante para a descoberta de novos alvos parasitas que podem ser explorados para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose e toxoplasmose.

Assim como as PLA₂s de *B. pauloensis*, outras fosfolipases A₂ isoladas das peçonhas de variadas espécies de serpentes já demonstraram efeitos antiparasitários e antimicrobianos. A ação citotóxica de PLA₂s em *Leishmania sp.* foi avaliada pela viabilidade do parasito em alguns estudos (STÁBELI et al., 2006; COSTA et al., 2008; TORRES et al., 2010; PEICHOTO et al., 2011). Moura e colaboradores (2014) isolaram três fosfolipases do tipo A₂ da peçonha de *Bothrops mattogrossensis*, que foram denominadas de BmatTX-I, BmatTX-II e BmatTX-III, e essas isoformas manifestaram citotoxicidade contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Experimentos executados por Castillo e colaboradores (2012) empregaram culturas *in vitro* do parasito *Plasmodium falciparum*, e seus resultados sugerem que as PLA₂s purificadas a partir da peçonha de *Bothrops asper* apresentam potencial antiplasmodial. Os efeitos antibacterianos das proteínas BthTx-I e BthTx-II isoladas da peçonha da espécie de serpente *Bothrops jararacussu* foram avaliados contra bactérias

Gram-negativas *Xanthomonas axonopodis. pv. passiflorae*, e ambas as PLA₂s compreenderam atividade antibacteriana (BARBOSA et al., 2005).

Azevedo e colaboradores (2016) investigaram a atividade antitumoral da BnSP-6 sobre células de câncer de mama MDA-MB-231, uma linhagem de células triplo negativa e altamente metastática. Os autores demonstraram que a PLA₂ BnSP-6 foi citotóxica para células MDA-MB-231 e apresentou baixa citotoxicidade para células de mama não tumorigênica MCF10A, relevando uma especificidade celular por alvos na célula tumoral. Além disso, a PLA₂ BnSP-6 foi capaz de estimular a autofagia promovendo a formação de vacúolos autofágicos e induzir apoptose, confirmada pelo aumento da expressão de genes relacionados a via apoptótica. Também foi demonstrado por esses autores que a BnSP-6 foi capaz de inibir a adesão e migração de células MDA-MB-231, eventos importantes para metástase tumoral. Por fim, a PLA₂ BnSP-6 foi capaz de provocar um aumento da expressão de genes BRCA2 e TP53, que codificam proteínas caracterizadas como supressoras de tumor (AZEVEDO, et. al., 2016). O efeito citotóxico causado por BnSP-6 foi consideravelmente menor contra a linhagem celular de mama não tumoral (MCF10A), sugerindo que a enzima apresentou uma possível preferência por alvos em células cancerígenas, somando aos efeitos antitumorais, propõe-se aplicações farmacêuticas desta PLA₂ como um agente antiangiogênico e anti-metastático (AZEVEDO et al., 2016).

Diversos estudos já exploraram o efeito antitumoral de fosfolipases A₂ de peçonhas de serpentes sobre diferentes linhagens celulares. A BthTX-I, oriunda da peçonha de *Bothrops jararacussu* exibiu citotoxicidade induzida nas células Jurkat, B16F10 e S180 (GEBRIM et al., 2009). Uma fosfolipase miotóxica MjTX-II, purificada a partir da peçonha de *Bothrops moojeni* demonstrou atividade antitumoral contra o tumor ascítico de Erlich, além de em adenocarcinoma de mama humano (SK-BR-3) e células Jurkat (STÁBELI et al., 2006). As fosfolipases também já demonstraram possuir

capacidade de interferir na viabilidade induzindo a morte celular por autofagia ou apoptose como em linhagem celular leucêmica mielóide K562 (YAN et al., 2006). Há dois possíveis mecanismos que podem expor o potencial terapêutico das PLA₂s contra as linhagens de células tumorais: a ação citotóxica diretamente nas células e/ou mudanças nos processos fundamentais para o crescimento do tumor, como o efeito inibitório de algumas PLA₂s na angiogênese (RODRIGUES et al., 2015).

As PLA₂s BnpTX-I e BnpTXI-II também foram exploradas quanto aos seus aspectos bioquímicos e funcionais. Ambas as proteínas foram capazes de induzir citotoxicidade sobre células C2C12 mioblastos e miotubos, bem como induzir miotoxicidade, edema e letalidade em camundongos. Além disso, BnpTX-I possui elevada atividade anticoagulante, bactericida contra bactérias Gram negativas (*E. coli*) e Gram positivas (*S. aureus*), e induz um bloqueio neuromuscular em nervo frênico extraídos de camundongos (RODRIGUES et al, 2004).

As PLA₂s ácidas Asp 49 são enzimas menos exploradas na literatura quanto aos seus efeitos biológicos e potenciais terapêuticos em relação às Lys49-PLA₂s básicas. Em grande parte das espécies de serpentes botrópicas, o conteúdo de PLA₂s ácidas é menor que o das básicas, sendo este uma das condições para o menor número de trabalhos publicados (CALVETE, JUÁREZ e SANZ, 2007). Muitas das PLA₂s ácidas já encontradas apresentam fraca ou nenhuma potência letal em camundongos, outras exibem atividades miotóxicas, hipotensoras, desencadeiam bloqueio neuromuscular e inibição da agregação plaquetária (FERNÁNDEZ, et al., 2010). Essas fosfolipases têm sido caracterizadas como enzimas que possuem uma alta atividade catalítica, geralmente não possuem muitas atividades tóxicas, e exibem múltiplos efeitos farmacológicos (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002). Já em concentrações maiores, as PLA₂s ácidas podem desencadear atividades tóxicas como congestão pulmonar, hemorragia intraperitoneal, inibição da retração do coágulo, alterações no tecido

muscular com o aumento dos níveis de creatina quinase (CLEMENT et al., 2012) e induzir lesões em tecidos do fígado, pulmão e coração (NISENBOM; SEKI e VIDAL, 1986).

Outras atividades têm sido demonstradas para as PLA₂s Aps-49 ácidas isoladas de peçonhas de serpentes. Teixeira (2011) mostraram efeito citotóxico sobre células tumorais, bactérias, fungos e leishmanias, inibição da agregação plaquetária e coagulação do plasma e efeito hipotensor *in vivo* utilizando a enzima BpirPLA₂-I, isolada da peçonha de *B. pirajai*. Rudrammaji e Gowda (1998) avaliaram a capacidade inibitória do crescimento da massa tumoral do tumor ascítico de Ehrlich por PLA₂s ácidas da peçonha de *Naja naja naja*, e pesquisadores como Bazaa e colaboradores (2009) demonstraram que MVL-PLA₂ isolada de *Macrovipera lebetina transmediterranea* induziu a adesão e migração celular.

As PLA₂s ácidas da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* ainda são pouco exploradas e o entendimento de suas características tanto estruturais quanto funcionais poderá colaborar para um melhor discernimento de seu mecanismo de ação frente às suas atividades biológicas

BpPLA₂ e BpPLA₂-TXI de *B. pauloensis* foram capazes de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno e ADP (RODRIGUES et al., 2007), mostrando uma potencialidade ao tratamento de disfunções plaquetárias relacionadas a agregação, como a trombose. Porém, Huang e colaboradores. (1984) demonstraram que essa inibição pode ser independente de atividade catalítica. Wang et al. (1996) demonstraram que uma PLA₂ ácida de *A. halys pallas* continha um domínio aromático associado com resíduos ácidos que poderiam estar envolvidos na inibição da agregação plaquetária.

Santos-filho e colaboradores (2008) testaram a capacidade de inibição da agregação plaquetária por BmooTX-I, isolada de *Bothrops moojeni*, a qual foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por agonistas fisiológicos como colágeno ou ADP de maneira dependente da concentração. Outras PLA₂ ácidas que exibem inibição da agregação

plaquetária foram purificadas, tais como LM-PLA₂-I e LM-PLA₂-II de *Lachesis muta* (FULY et al., 2000; FULY et al., 2002) e BE-IPLA₂ de *B. erythromelas* (MODESTO et al., 2006). Quando testada em plasma rico em plaquetas, a enzima BE-I-PLA₂ demonstrou efeito inibitório eficaz na agregação induzida por ácido araquidônico e colágeno, exceto por ADP, e não modificou a agregação em plaquetas lavadas (MODESTO et al., 2006). Sobrinho (2014) por meio de ensaio de agregação plaquetária detectou que ambas as PLA₂s purificadas de *Bothrops brazili* (Braziliase-I e II) indicaram apresentar atividade antiplaquetária sobre a agregação induzida por ADP e a Braziliase-II sobre a agregação induzida por colágeno também.

Estes estudos de inibição da agregação plaquetária utilizando PLA₂s de peçonha ofídica podem indicar um possível direcionamento para novas pesquisas visando o entendimento dos processos moleculares envolvidos na agregação de plaquetas, bem como tais estudos permitem a geração de novos modelos moleculares para o desenho racional de futuros fármacos para o tratamento de desordens trombóticas.

5. CONCLUSÃO

De modo geral, diversas funções já foram descobertas sobre componentes bioativos purificados e caracterizados de peçonhas de serpentes. Os estudos realizados com as isoformas de PLA₂s de *Bothrops pauloensis* já isoladas demonstram que essas proteínas podem ser promissoras para a síntese de novas drogas ou úteis para revelar alvos moleculares importantes para o desenho racional de fármacos. Diferentemente das Asp49, as PLA₂s Lys49 não interagem com o cálcio do sítio ativo, sendo consideradas cataliticamente inativas, porém também apresentam efeitos citotóxicos e ambas possuem como possíveis alvos a hemostasia, indução da citotoxicidade contra formas parasitárias, microrganismos e variados tipos de

linhagens de células tumorais. O desenvolvimento de pesquisas nessa área representa grande importância, possibilitando um futuro desenvolvimento de fármacos obtidos a partir de fontes naturais, e com maior especificidade e eficácia, podendo apresentar também tratamentos com menores custos.

6. REFERÊNCIAS

ABE, Akira; SHAYMAN, James A.. Purification and Characterization of 1-O-Acylceramide Synthase, a Novel Phospholipase A₂ with Transacylase Activity. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 273, n. 14, p.8467-8474, 3 abr. 1998. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.14.8467>.

ACKERMANN, Elizabeth J.; KEMPNER, E. S.; DENNIS, E. A. Ca (2+) -independent cytosolic phospholipase A₂ from macrophage-like P388D1 cells. Isolation and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 12, p. 9227-9233, 1994.

AKIBA, Satoshi; SATO, Takashi. Cellular Function of Calcium-Independent Phospholipase A₂. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 27, n. 8, p.1174-1178, 2004. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.27.1174>.

ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 14, n. 12, p. 1173-1185, 2015.

AMARAL, A. N. D. **A general consideration of snake poisoning and observations on neotropical pit-vipers**, 1st ed.; Harvard University press: Cambridge, 1925.

ANDRIÃO-ESCARSO, Sílvia H et al. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 64, n. 4, p.723-732, ago. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01210-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01210-8).

ANDRIÃO-ESCARSO, Sílvia H. et al. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, [s.l.], v. 82, n. 8, p.755-763, ago. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0300-9084\(00\)01150-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0300-9084(00)01150-0).

ANGULO, Yamileth et al. Isolation and Characterization of a Myotoxic Phospholipase A₂ from the Venom of the Arboreal Snake *Bothriechis (Bothrops) schlegelii* from Costa

Rica. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 339, n. 2, p.260-266, mar. 1997. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1996.9865>.

ARAÚJO, Albetiza Lôbo de; RADVANYI, François; BON, Cassian. Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom: Molecular and enzymatic properties. **Toxicon**, [s.l.], v. 32, n. 9, p.1069-1081, set. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90391-3](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(94)90391-3).

AZEVEDO, Fernanda van Petten Vasconcelos et al. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA₂ homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 82, p.671-677, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.080>.

BALSINDE, Jesús; DENNIS, Edward A.. Distinct Roles in Signal Transduction for Each of the Phospholipase A Enzymes Present in P388D Macrophages. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 271, n. 12, p.6758-6765, 22 mar. 1996. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.12.6758>.

BALSINDE, J. et al. Arachidonic acid mobilization in P388D1 macrophages is controlled by two distinct Ca (2+)-dependent phospholipase A₂ enzymes. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 91, n. 23, p.11060-11064, 8 nov. 1994. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.23.11060>.

BARBOSA, P.s.f. et al. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 46, n. 4, p.376-386, set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.04.024>.

BAZAA, Amine et al. MVL-PLA₂, a phospholipase A₂ from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. **Matrix Biology**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.188-193, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2009.03.007>.

BHAT, Manoj Kumar; GOWDA, T.veerabasappa. Purification and characterization of a myotoxic phospholipase A₂ from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 27, n. 8, p.861-873, jan. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(89\)90098-6](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(89)90098-6).

BORGES, Isabela Pacheco et al. Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induced by BnSP-7, a Lys49-phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 119, p.84-91, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.05.010>.

BORGES, Márcia H et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l.], v. 127, n. 1, p.21-30, set. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0305-0491\(00\)00237-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0305-0491(00)00237-6).

BURKE, John E.; DENNIS, Edward A.. Phospholipase A₂ Biochemistry. **Cardiovascular Drugs And Therapy**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.49-59, 18 out. 2008a. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10557-008-6132-9>.

BURKE, John E.; DENNIS, Edward A.. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. **Journal Of Lipid Research**, [s.l.], v. 50, n. , p.237-242, 14 nov. 2008b. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.r800033-jlr200>.

CALDERON, Leonardo A. et al. Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2014, p.1-19, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/203639>.

CALGAROTTO, Andrana K. et al. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A₂ BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 51, n. 8, p.1509-1519, jun. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.03.030>.

CALVETE, Juan J.; JUÁREZ, Paula; SANZ, Libia. Snake venomics. Strategy and applications. **Journal Of Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 42, n. 11, p.1405-1414, 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jms.1242>.

CARRASCO, Paola A. et al. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American Bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, [s.l.], v. 41, n. 2, p.109-124, 7 fev. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-6409.2011.00511.x>.

CASTILLO, Juan et al. In Vitro Antiplasmodial Activity of Phospholipases A₂ and a Phospholipase Homologue Isolated from the Venom of the Snake *Bothrops asper*. **Toxins**, [s.l.], v. 4, n. 12, p.1500-1516, 14 dez. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins4121500>.

CHEN, S. C. A.; WIRGHT, L. C.; GOLDING, J. C.; SORREL, T. C. Purification and characterization of secretory phospholipase B, Isyosphospholipase and Iysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **The Biochemical journal**, v. 347, p. 431-439, 2000.

CHEN, Rui-hong; CHEN, Yuan-chung. Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon acutus* (five pace snake) and its effect on platelet aggregation. **Toxicon**, [s.l.], v. 27, n. 6, p.675-682, jan. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(89\)90018-4](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(89)90018-4).

CHIOATO, L.; ARAGAO, E. A.; FERREIRA, T. L.; DE MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H.; WARD, R. J. Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A₂ by scanning alanine mutagenesis. **Biochim. Biophys. Acta**. v.1768, p. 1247–1257, 2007.

CLARK, James D. et al. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA₂ contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. **Cell**, [s.l.], v. 65, n. 6, p.1043-1051, jun. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90556-e](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(91)90556-e).

CLARK, J. D.; MILONA, N.; KNOFF, J. L.. Purification of a 110-kilodalton cytosolic phospholipase A₂ from the human monocytic cell line U937. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 87, n. 19, p.7708-7712, 1 out. 1990. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.19.7708>.

CLEMENT, Herlinda et al. Isolation, amino acid sequence and biological characterization of an “aspartic-49” phospholipase A₂ from *Bothrops (Rhinocerocephis) ammodytoides* venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 60, n. 7, p.1314-1323, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.019>.

CONTARDI, A.; ERCOLI, A. Über die enzymatische Spaltung der Lecithine und Lysocithine. **Biochem. Z**, v. 261, p. 275-302, 1933.

COSTA, Tassia R. et al. Myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, [s.l.], v. 29, n. 10, p.1645-1656, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2008.05.021>.

DAMICO, Daniela C.s. et al. Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp49 phospholipase A₂ isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, [s.l.], v. 1726, n. 1, p.75-86, out. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.05.022>.

DA SILVA-GIOTTO, M. T. et al. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes I bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. **Prot. Struct. Funct. Genet.** v. 30, p. 442 – 454, 1998.

DAWSON, R. M. C. The phospholipase B of liver. **Biochemical Journal**, v. 64, n. 1, p. 192, 1956.

DENEGRI, María E. Garcia et al. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. **Toxicon**, [s.l.], v. 56, n. 1, p.64-74, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.02.031>.

DENNIS, Edward A. et al. Phospholipase A₂ Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 111, n. 10, p.6130-6185, 12 out. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr200085w>.

DENNIS, Edward A.. 9 Phospholipases. **Lipid Enzymology**, [s.l.], p.307-353, 1983. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s1874-6047\(08\)60307-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1874-6047(08)60307-8).

DÍAZ, Cecilia et al. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Biomembranes**, [s.l.], v. 1070, n. 2, p.455-460, dez. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736\(91\)90086-n](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736(91)90086-n).

DIZ FILHO, E.b.s. et al. Enzymatic and structural characterization of new PLA₂ isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.104-114, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.10.021>.

DOERY, Hazel M.; PEARSON, Joan E. Phospholipase B in snake venoms and bee venom. **Biochemical Journal**, v. 92, n. 3, p. 599, 1964.

DUNCAN, Robin E. et al. Identification and Functional Characterization of Adipose-specific Phospholipase A₂(AdPLA). **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 283, n. 37, p.25428-25436, 9 jul. 2008. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m804146200>.

FAURE, G. Natural inhibitors of toxic phospholipases A₂. **Biochimie**, [s.l.], v. 82, n. 9-10, p.833-840, 10 set. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0300-9084\(00\)01175-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0300-9084(00)01175-5).

FENWICK, Allyson M. et al. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal Of The Linnean Society**, [s.l.], v. 156, n. 3, p.617-640, jul. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1096-3642.2008.00495.x>.

FERNÁNDEZ, Julián et al. Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: Biochemical and toxicological characterization☆. **Biochimie**, [s.l.], v. 92, n. 3, p.273-283, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2009.12.006>.

FERREIRA, Francis Barbosa. **Caracterização bioquímico-farmacológica de uma PLA₂ ácida isolada da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*)**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

FORTES-DIAS, Consuelo L.. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipases A₂ in the blood plasma of snakes. **Toxicon**, [s.l.], v. 40, n. 5, p.481-484, maio 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00274-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00274-4).

FRANCIS, Brian et al. Myotoxin II from *Bothrops asper* (terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 284, n. 2, p.352-359, fev. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90307-5](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(91)90307-5).

FREYBERG, Zachary; BOURGOIN, Sylvain; SHIELDS, Dennis. Phospholipase D₂ Is Localized to the Rims of the Golgi Apparatus in Mammalian Cells. **Molecular Biology Of The Cell**, [s.l.], v. 13, n. 11, p.3930-3942, nov. 2002. American Society for Cell Biology (ASCB). <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.02-04-0059>.

FREYBERG, Zachary et al. Intracellular Localization of Phospholipase D₁ in Mammalian Cells. **Molecular Biology Of The Cell**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.943-955, abr. 2001. American Society for Cell Biology (ASCB). <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.12.4.943>.

FULY, André L. et al. Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 63, n. 9, p.1589-1597, maio 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)00873-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952(02)00873-0).

FULY, André L. et al. Myotoxic activity of an acidic phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bush master) snake venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 38, n. 7, p.961-972, jul. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101\(99\)00208-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101(99)00208-1).

GANENDREN, R.; CARTER, E.; SORREL, T.; WILMER, F. & WRIGHT, L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1006-1015, 2006.

GEBRIM, Luiz Carlos et al. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A₂-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. **Biologicals**, [s.l.], v. 37, n. 4, p.222-229, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.01.010>.

GLASER, Keith B.. Regulation of Phospholipase A₂ Enzymes: Selective Inhibitors and their Pharmacological Potential. **Advances In Pharmacology**, [s.l.], p.31-66, 1995. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s1054-3589\(08\)61011-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1054-3589(08)61011-x).

GONZALEZ, F. H., CERONI da SILVA, S. Bioquímica hormonal. In: **Introdução à bioquímica hormonal**. 2.ed. Porto Alegre (RS): Editora da UFRGS, Cap.7, p. 251-312, 2006.

GUTIÉRREZ, José María; OWNBY, Charlotte L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, [s.l.], v. 42, n. 8, p.915-931, dez. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.005>.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini R. M. (Ed.). **Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**, Chichester: Wiley & Sons. p. 321-52, 1997.

GUTIÉRREZ, Josémaría; LOMONTE, Bruno. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, [s.l.], v. 33, n. 11, p.1405-1424, nov. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00085-z](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(95)00085-z).

HARRIS, J.b.. Myotoxic phospholipases A₂ and the regeneration of skeletal muscles. **Toxicon**, [s.l.], v. 42, n. 8, p.933-945, dez. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.011>.

HIRAOKA, Miki; ABE, Akira; SHAYMAN, James A.. Cloning and Characterization of a Lysosomal Phospholipase A₂, 1-O-Acylceramide Synthase. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 277, n. 12, p.10090-10099, 14 jan. 2002. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m111977200>

HUANG, Huei-chen. Release of slow reacting substance from the guinea-pig lung by phospholipases A₂ of *Vipera russelli* snake venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.359-372, jan. 1984. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(84\)90080-1](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(84)90080-1).

INOUE, Keizo; ARAI, Hiroyuki; AOKI, Junken. Phospholipase A₁ Structures, Physiological and Patho-physiological Roles in Mammals. **Lipases And Phospholipases In Drug Development**, [s.l.], p.23-39, 7 jan. 2005. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <http://dx.doi.org/10.1002/3527601910.ch2>.

JAIN, Deepika; KUMAR, Sudhir. Snake Venom: A Potent Anticancer Agent. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**, [s.l.], v. 13, n. 10, p.4855-4860, 31 out. 2012. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention. <http://dx.doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.10.4855>.

JENKINS, G. M.; FROHMAN, M. A.. Phospholipase D: a lipid centric review. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 62, n. 19-20, p.2305-2316, 7 set. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-005-5195-z>.

KASTURI, S.; GOWDA, T.veerabasappa. Purification and characterization of a major phospholipase A₂ from *Russell's viper (Vipera russelli)* venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.229-237, jan. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(89\)90136-0](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(89)90136-0).

KETELHUT, D.f.j et

al. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A₂ isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, [s.l.], v. 85, n. 10, p.983-991, out. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2003.09.011>.

KINI, R Manjunatha. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, [s.l.], v. 42, n. 8, p.827-840, dez. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.002>.

KÖHLER, Gerwald A. et al. Phospholipase A₂ and Phospholipase B activities in fungi. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [s.l.], v. 1761, n. 11, p.1391-1399, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.09.011>.

KRAMER, Ruth M. et al. Cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) and lipid mediator release in the brain. **Journal of lipid mediators and cell signalling**, v. 14, n. 1-3, p. 3-7, 1996.

KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Micro**, v. 9, n. 3, p. 193-203, 2011.

KUDO, Ichiro; MURAKAMI, Makoto. Phospholipase A₂ enzymes. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, [s.l.], v. 68-69, p.3-58, ago. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0090-6980\(02\)00020-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0090-6980(02)00020-5).

LIZANO, Sergio; DOMONT, Gilberto; PERALES, Jonas. Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, [s.l.], v. 42, n. 8, p.963-977, dez. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.007>.

LOMONTE, Bruno; RANGEL, José. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, [s.l.], v. 60, n. 4, p.520-530, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.007>.

LOMONTE, Bruno; ANGULO, Yamileth; MORENO, Edgardo. Synthetic Peptides Derived from the C-Terminal Region of Lys49 Phospholipase A₂ Homologues from *Viperidae* Snake Venoms: Biomimetic Activities and Potential Applications. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 16, n. 28, p.3224-3230, jul. 2010.

LOMONTE, Bruno; ANGULO, Yamileth; SANTAMARÍA, Carlos. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115–129 in Lys49 myotoxic phospholipases A₂ from snake venoms. **Toxicon**, [s.l.], v. 42, n. 3, p.307-312, set. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101\(03\)00149-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101(03)00149-1).

MACHADO, Taís; SILVA, Vinícius X.; SILVA, Maria José de J.. Phylogenetic relationships within *Bothrops neuwiedi* group (Serpentes, Squamata): Geographically highly-structured lineages, evidence of introgressive hybridization and Neogene/Quaternary diversification. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, [s.l.], v. 71, p.1-14, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2013.10.003>.

MAGRO, Angelo J. et al. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 311, n. 3, p.713-720, nov. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.047>.

MARPLES, Elizabeth A.; THOMPSON, R. H. S. The distribution of phospholipase B in mammalian tissues. **Biochemical Journal**, v. 74, n. 1, p. 123, 1960.

MODESTO, Jeanne Claine de Albuquerque et al. BE-I-PLA₂, a novel acidic phospholipase A₂ from *Bothrops erythromelas* venom: Isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I₂ release by endothelial cells. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 72, n. 3, p.377-384, jul. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2006.04.032>.

MOURA, Andréa A. de et al. Purification and Biochemical Characterization of Three Myotoxins from

Bothrops matogrossensis Snake Venom with Toxicity against *Leishmania* and Tumor Cells. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2014, p.1-13, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/195356>.

MOURA-DA-SILVA, A.m. et al. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of bothrops snakes. **Toxicon**, [s.l.], v. 29, n. 6, p.713-723, jan. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90063-w](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(91)90063-w).

NAKAGAWA, Hiroshi et al. Inhibition of PLD1 activity causes ER stress via regulation of COPII vesicle formation. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 490, n. 3, p.895-900, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.137>.

NIEWERTH, M.; KORTING, H. C.. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses**, [s.l.], v. 44, n. 9-10, p.361-367, nov. 2001. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00685.x>.

NISENBOM, H.e.; SEKI, C.; VIDAL, J.c.. Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.259-272, jan. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(86\)90151-0](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(86)90151-0).

NISHIOKA, Sergio de Andrade; SILVEIRA, Paulo Vitor Portella. A Clinical and Epidemiologic Study of 292 Cases of Lance-Headed Viper Bite in a Brazilian Teaching Hospital. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 47, n. 6, p.805-810, 1 dez. 1992. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1992.47.805>.

NOGUCHI, Shunji. Über die lezithinspaltenden fermente. **The Journal of Biochemistry**, v. 36, p. 113-129, 1944.

NUNES, Débora C. O. et al. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology**, [s.l.], v. 140, n. 07, p.844-854, 27 fev. 2013. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0031182013000012>.

NUNES, Débora C.o. et al. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A₂ from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 154, n. 3, p.226-233, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.06.003>.

NÚÑEZ, Vitelbina et al. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. **Toxicon**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.91-101, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.04.013>.

NÚÑEZ, C. E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. *Toxicon*. v. 39 (10), p. 1587-1594, 2001.

OLIVEIRA, Carolina de Freitas et al. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedi) pauloensis* snake venom. *Toxicon*, [s.l.], v. 53, n. 5, p.560-569, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.025>.

OLIVEIRA, Carolina de Freitas et al. Estudo da lesão tecidual local induzida por miotoxinas isoladas da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada). *Horizonte Científico*, v. 1, n. 1, 2007.

OLIVEIRA, A. H. C. de et al. A pH-Induced Dissociation of the Dimeric Form of a Lysine 49-Phospholipase A₂ Abolishes Ca²⁺-Independent Membrane Damaging Activity†. *Biochemistry*, [s.l.], v. 40, n. 23, p.6912-6920, jun. 2001. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi0026728>.

OMORI-SATOH, Tamotsu et al. Purification and characterization of an antihemorrhagic factor in the serum of *Trimeresurus flavoviridis*, a crotalid. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Protein Structure*, [s.l.], v. 285, n. 2, p.414-426, dez. 1972. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2795\(72\)90328-5](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2795(72)90328-5).

OVADIA, M.; KOCHVA, E.. Neutralization of Viperidae and Elapidae snake venoms by sera of different animals. *Toxicon*, [s.l.], v. 15, n. 6, p.541-547, jan. 1977. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(77\)90105-2](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(77)90105-2).

OWNBY, Charlotte L et al. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. *Toxicon*, [s.l.], v. 37, n. 3, p.411-445, mar. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101\(98\)00188-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101(98)00188-3).

OWNBY, Charlotte L; COLBERG, Terry R; WHITE, Steven P. Isolation, characterization and crystallization of a phospholipase A₂ myotoxin from the venom of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Toxicon*, [s.l.], v. 35, n. 1, p.111-124, jan. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101\(96\)00054-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101(96)00054-2).

PAL, Sanjoy Kumar et al. Snake venom as therapeutic agents: From toxin to drug development. *Indian Journal Of Experimental Biology*. [s, l], p. 1153-1358. dez. 2002.

PONCE-SOTO, Luis Alberto et al. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects*, [s.l.], v. 1770, n. 4, p.585-593, abr. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.11.015>.

PEICHOTO, María E. et al.
A comparative study of the effects of venoms from five rear-

fanged snake species on the growth of *Leishmania major*: Identification of a protein with inhibitory activity against the parasite. **Toxicon**, [s.l.], v. 58, n. 1, p.28-34, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.04.018>.

RODRIGUES, Renata S. et al. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal Of Proteomics**, [s.l.], v. 75, n. 9, p.2707-2720, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.028>.

RODRIGUES, Renata S. et al. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.153-165, jul. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.03.005>.

RODRIGUES, Renata Santos. **Purificação e caracterização de uma nova fosfolipase A₂ ácida da peçonha de *Bothrops pauloensis***. 2006. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

RODRIGUES, Veridiana et al. *Bothrops pauloensis* Snake Venom Toxins: The Search for New Therapeutic Models. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 15, n. 7, p.670-684, 10 mar. 2015. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1568026615666150217120347>.

RODRIGUES, Veridiana M et al. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.305-314, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.06.008>.

RODRIGUES, Veridiana M et al. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [s.l.], v. 121, n. 3, p.215-222, nov. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1095-6433\(98\)10136-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1095-6433(98)10136-8).

RUDRAMMAJI, L.m.s.;

GOWDA, T.v.. Purification and characterization of three acidic, cytotoxic phospholipases A₂ from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 36, n. 6, p.921-932, jun. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101\(97\)00097-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101(97)00097-4).

RUFINI, S. et al. Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. **Biochemistry**, [s.l.], v. 31, n. 49, p.12424-12430, 15 dez. 1992. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi00164a018>.

RUSSELL, Findlay E.. Pharmacology of animal venoms. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.849-873, nov. 1967. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cpt196786849>.

SAIKIA, Debashree;

MUKHERJEE, Ashis K.. An acidic phospholipase A₂

THAKUR, Rupamoni;

(RVVA-PLA₂-I) purified from *Daboia russelli* venom exerts its anticoagulant activity by enzymatic hy

drolisis of plasma phospholipids and by non-enzymatic inhibition of factor Xa in a phospholipids/Ca²⁺ independent manner. **Toxicon**, [s.l.], v. 57, n. 6, p.841-850, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.02.018>.

SAITO, Kunihiko; HANAHAN, Donald J.. A Study of the Purification and Properties of the Phospholipase A of *Crotalus adamanteus* Venom*. **Biochemistry**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.521-532, 25 maio 1962. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi00909a025>.

SANTOS-FILHO, Norival A. et al. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 52, n. 8, p.908-917, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.08.020>.

SCHALOSKE, Ralph H.; DENNIS, Edward A.. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [s.l.], v. 1761, n. 11, p.1246-1259, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2006.07.011>.

SCOTT, D. et al. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. **Science**, [s.l.], v. 250, n. 4987, p.1541-1546, 14 dez. 1990. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.2274785>.

SELVY, Paige E. et al. Phospholipase D: Enzymology, Functionality, and Chemical Modulation. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 111, n. 10, p.6064-6119, 12 out. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr200296t>.

SERRANO, Solange M.t. et al. A Novel Phospholipase A₂, BJ-PLA₂, 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**, [s.l.], v. 367, n. 1, p.26-32, jul. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1999.1230>.

SHAPIRO, B. Purification and properties of a lysolecithinase from pancreas. **Biochemical Journal**, v. 53, n. 4, p. 663, 1953.

SHARP, John D. et al. Molecular cloning and expression of human Ca (2+)-sensitive cytosolic phospholipase A₂. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 23, p. 14850-14853, 1991.

SHEN, D.; NOODEH, A. D.; KAZEMI, A.; GRILLOT, R.; ROBSON, G & BRUHERE, J. Characterisation and expression of phospholipases B from opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, p. 87-93, 2004.

SILVA, V. X. In: The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere; Campbell, Ed.: London, 2004; pp. 410-422.

SIX, David A.; DENNIS, Edward A.. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) -**

Molecular And Cell Biology Of Lipids, [s.l.], v. 1488, n. 1-2, p.1-19, out. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00105-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00105-0).

SMITH, J. B.; SILVER, M. J.; WEBSTER, G. R.. Phospholipase A1 of human blood platelets (Short Communication). **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 131, n. 3, p.615-618, mar. 1973. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj1310615>.

SOARES, Andreimar; FONTES, Marcos; GIGLIO, Jose. Phospholipase A₂ Myotoxins from *Bothrops* Snake Venoms: Structure- Function Relationship. **Current Organic Chemistry**, [s.l.], v. 8, n. 17, p.1677-1690, 1 nov. 2004. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1385272043369610>.

SOARES, Andreimar M et al. Dissociation of Enzymatic and Pharmacological Properties of Piratoxins-I and -III, Two Myotoxic Phospholipases A₂ from *Bothrops pirajai* Snake Venom. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 387, n. 2, p.188-196, mar. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.2000.2244>.

SOARES, Andreimar M et al. Structural and Functional Characterization of Myotoxin I, a Lys49 Phospholipase A₂ Homologue from *Bothrops moojeni* (*Caissaca*) Snake Venom. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 373, n. 1, p.7-15, jan. 2000a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1999.1492>.

SOARES, Andreimar M et al. Structural and Functional Characterization of BnSP-7, a Lys49 Myotoxic Phospholipase A₂ Homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* Venom. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 378, n. 2, p.201-209, jun. 2000b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.2000.1790>.

SOARES, A.m. et al. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (*caissaca*) venom: Biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.503-514, abr. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101\(97\)00133-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101(97)00133-5).

SOBRINHO, Juliana C. et al. Anti-platelet aggregation activity of two novel acidic Asp49-phospholipases A₂ from *Bothrops* brazili snake venom. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 107, p.1014-1022, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.069>.

SOBRINHO, Juliana C. **Isolamento e caracterização bioquímica e estrutural de fosfolipases A₂ ácidas do veneno da serpente *Bothrops brazili***. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2014.

STÁBELI, Rodrigo G. et al. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 142, n. 3-4, p.371-381, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.020>.

STÁBELI, Rodrigo Guerino et al. Antibodies to a fragment of the *Bothrops moojeni* l-amino acid oxidase cross-react with snake venom components unrelated to the parent

protein. **Toxicon**, [s.l.], v. 46, n. 3, p.308-317, set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.04.020>.

TEIXEIRA, Sabrina S. et al. Molecular characterization of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. **Archives Of Toxicology**, [s.l.], v. 85, n. 10, p.1219-1233, 18 fev. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-011-0665-6>.

THWIN, Maung-maung et al. Functional site of endogenous phospholipase A₂ inhibitor from python serum. **European Journal Of Biochemistry**, [s.l.], v. 269, n. 2, p.719-727, jan. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02711.x>.

TORRES, Alba Fabiola Costa et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and l-amino acid oxidase. **Toxicon**, [s.l.], v. 55, n. 4, p.795-804, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.013>.

VINDAS, Julio et al. A novel pentameric phospholipase A₂ myotoxin (PophPLA 2) from the venom of the pit viper *Porthidium ophryomegas*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 118, p.1-8, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.028>.

VONK, Freek J. et al. Snake venom: From fieldwork to the clinic. **Bioessays**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.269-279, 27 jan. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201000117>.

WANG, Geliang; RYU, Stephen; WANG, Xuemin. Plant Phospholipases: An Overview. **Lipases And Phospholipases**, [s.l.], p.123-137, 2012. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_8.

WANG, Xiao-qiang et al. Crystal Structure of an Acidic Phospholipase A₂ from the Venom of *Agkistrodon halyspallas* at 2.0 Å Resolution. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 255, n. 5, p.669-676, fev. 1996. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1996.0054>.

WARD, R.j. et al. Refolding and Purification of Bothropstoxin-I, a Lys49-Phospholipase A₂ Homologue, Expressed as Inclusion Bodies in *Escherichia coli*. **Protein Expression And Purification**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.134-140, fev. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/prev.2000.1353>.

WITTCOFF, H. **The phosphatides**. Ed. Reinhold Publishing Corporation, New York, p.99-115, 1951.

WOLF, Matthew J. et al. Depletion of Intracellular Calcium Stores Activates Smooth Muscle Cell Calcium-independent Phospholipase A₂. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 272, n. 3, p.1522-1526, 17 jan. 1997. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.3.1522>.

WU, Tai-wing; TINKER, David O.. Phospholipase A₂ from *Crotalus atrox* venom. I. Purification and some properties. **Biochemistry**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.1558-1568, abr. 1969. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi00832a035>.

YAN, Ci-hui et al. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells. **Toxicon**, [s.l.], v. 47, n. 5, p.521-530, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.01.010>.

ZOUARI-KESSENTINI, Raoudha et al. Antitumoral Potential of Tunisian Snake Venoms Secreted Phospholipases A₂. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2013, p.1-9, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/391389>.

7. NORMAS DA REVISTA TOXICON

Estrutura do artigo

Subdivisão - seções numeradas: Divida seu artigo em seções claramente definidas e numeradas. As subseções devem ser numeradas como 1.1 (em seguida, 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (o resumo não está incluído na numeração da seção). Use esta numeração também para referência cruzada interna: não se refira apenas ao 'texto'. Qualquer subseção pode receber um breve título. Cada título deve aparecer em sua própria linha separada.

Introdução: Indique os objetivos do trabalho e forneça um contexto adequado, evitando uma pesquisa bibliográfica detalhada ou um resumo dos resultados.

Material e métodos: Fornecer detalhes suficientes para permitir que o trabalho seja reproduzido por um pesquisador independente. Os métodos já publicados devem ser resumidos e indicados por uma referência. Se estiver citando diretamente de um método publicado anteriormente, use aspas e cite também a origem. Quaisquer modificações nos métodos existentes também devem ser descritas.

Experimental: Fornecer detalhes suficientes para permitir que o trabalho seja reproduzido por um pesquisador independente. Os métodos já publicados devem ser resumidos e indicados por uma referência. Se estiver citando diretamente de um método publicado anteriormente, use aspas e cite também a origem. Quaisquer modificações nos métodos existentes também devem ser descritas.

Procedimentos experimentais: Todos os experimentos em animais devem ser realizados de acordo com a Lei de Animais (Procedimentos Científicos) do Reino Unido de 1986 e diretrizes associadas, a Diretriz do Conselho das Comunidades Europeias de 24 de novembro de 1986 (86/609 / EEC) ou o Guia do National Institutes of Health para o cuidado e uso de animais de Laboratório (NIH Publications No. 8023, revisado em 1978) e os autores devem indicar claramente no manuscrito que tais diretrizes foram seguidas. Todos os estudos em animais precisam garantir que eles estejam em conformidade com as diretrizes da ARRIVE. Mais informações podem ser encontradas em <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

Teoria / cálculo: Uma seção teórica deve estender, não repetir, o pano de fundo do artigo já tratado na Introdução e lançar as bases para trabalhos futuros. Em contraste, uma seção de cálculo representa um desenvolvimento prático de uma base teórica.

Resultados: Os resultados devem ser claros e concisos.

Discussão: Isso deve explorar o significado dos resultados do trabalho, não repeti-los. Uma seção combinada de Resultados e Discussão é frequentemente apropriada. Evite citações extensas e discussão de literatura publicada.

Conclusões: As principais conclusões do estudo podem ser apresentadas em uma breve seção de Conclusões, que pode ser independente ou formar uma subseção de uma seção Discussão ou Resultados e Discussão.

Apêndices: Se houver mais de um apêndice, eles devem ser identificados como A, B, etc. Fórmulas e equações nos apêndices devem receber numeração separada: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc .; em um apêndice subsequente, a Eq. (B.1) e assim por diante. Similarmente para tabelas e figuras: Tabela A.1; Fig. A.1, etc.

Informações essenciais da página de título

- **Título.** Conciso e informativo. Títulos são frequentemente usados em sistemas de recuperação de informações. Evite abreviações e fórmulas sempre que possível.

- **Nomes e afiliações dos autores.** Por favor, indique claramente o (s) nome (s) e nome (s) de família de cada autor e verifique se todos os nomes estão escritos com precisão. Você pode adicionar seu nome entre parênteses em seu próprio script por trás da transliteração em inglês. Apresente os endereços de afiliação dos autores (onde o trabalho real foi feito) abaixo dos nomes. Indique todas as afiliações com uma letra em sobrescrito minúscula imediatamente após o nome do autor e em frente ao endereço apropriado. Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor.

- **Autor correspondente.** Indique claramente quem irá lidar com correspondência em todas as fases de arbitragem e publicação, também pós-publicação. Esta responsabilidade inclui responder a quaisquer consultas futuras sobre Metodologia e Materiais. Assegure-

se de que o endereço de e-mail seja fornecido e que os detalhes de contato sejam mantidos atualizados pelo autor correspondente.

• **Endereço presente / permanente.** Se um autor se mudou desde que o trabalho descrito no artigo foi feito, ou estava em visita no momento, um "endereço atual" (ou "endereço permanente") pode ser indicado como uma nota de rodapé para o nome desse autor. O endereço no qual o autor realmente fez o trabalho deve ser mantido como o endereço principal de afiliação. Números árabes sobrescritos são usados para tais notas de rodapé.

Resumo: Um resumo conciso e factual é necessário. O resumo deve indicar brevemente o objetivo da pesquisa, os principais resultados e principais conclusões. Um resumo é frequentemente apresentado em separado do artigo, por isso deve ser capaz de ficar sozinho. Por esta razão, as Referências devem ser evitadas, mas se for essencial, então cite o (s) autor (es) e o (s) ano (s). Além disso, abreviações não-padrão ou incomuns devem ser evitadas, mas se essenciais devem ser definidas em sua primeira menção no próprio resumo.

Resumo gráfico: Embora um resumo gráfico seja opcional, seu uso é incentivado, pois atrai mais atenção para o artigo on-line. O resumo gráfico deve resumir o conteúdo do artigo em uma forma concisa e pictórica projetada para capturar a atenção de um público amplo. Os resumos gráficos devem ser enviados como um arquivo separado no sistema de submissão online. Tamanho da imagem: forneça uma imagem com um mínimo de 531 × 1328 pixels (h × w) ou proporcionalmente mais. A imagem deve ser legível em um tamanho de 5 × 13 cm usando uma resolução de tela regular de 96 dpi. Tipos de arquivos preferidos: arquivos TIFF, EPS, PDF ou MS Office. Você pode ver os Exemplos de Resumos Gráficos em nosso site de informações. Autores podem fazer uso dos Serviços de Ilustração da Elsevier garantir a melhor apresentação de suas imagens e de acordo com todos os requisitos técnicos.

Destques: Destques são obrigatórios para este periódico. Eles consistem em uma pequena coleção de pontos que transmitem os principais resultados do artigo e devem ser enviados em um arquivo separado no sistema de submissão on-line. Por favor, use 'Destques' no nome do arquivo e inclua de 3 a 5 marcadores (máximo de 125 caracteres, incluindo espaços, ou, no máximo, 20 palavras por ponto de marcador). Veja <http://www.elsevier.com/highlights> para exemplos.

Palavras-chave: Imediatamente após o resumo, forneça no máximo 6 palavras-chave, usando ortografia americana e evitando termos gerais e plurais e vários conceitos (evite, por exemplo, 'e', 'de'). Seja poupado com abreviaturas: apenas as abreviaturas firmemente estabelecidas no campo podem ser elegíveis. Essas palavras-chave serão usadas para propósitos de indexação.

Abreviações: Defina abreviações que não são padrão neste campo em uma nota de rodapé a ser colocada na primeira página do artigo. Tais abreviaturas que são inevitáveis no resumo devem ser definidas em sua primeira menção, assim como na nota de rodapé. Assegure a consistência das abreviaturas ao longo do artigo.

Agradecimentos: Agrupe os agradecimentos em uma seção separada no final do artigo antes das referências e, portanto, não os inclua na página de título, como uma nota de rodapé no título ou de outra forma. Liste aqui as pessoas que forneceram ajuda durante a pesquisa (por exemplo, fornecendo ajuda no idioma, escrevendo ajuda ou revisando o artigo, etc.).

Formatação de fontes de financiamento

Citar fontes de financiamento desta forma padrão para facilitar a conformidade com os requisitos do financiador:

Financiamento: Este trabalho foi apoiado pelos Institutos Nacionais de Saúde [números concedidos xxxx, yyyy]; a Fundação Bill & Melinda Gates, Seattle, WA [número de concessão zzzz]; e os Institutos de Paz dos Estados Unidos [conceder número aaaa].

Não é necessário incluir descrições detalhadas sobre o programa ou tipo de subsídios e prêmios. Quando o financiamento for proveniente de uma bolsa em bloco ou de outros recursos disponíveis para uma universidade, faculdade ou outra instituição de pesquisa, envie o nome do instituto ou organização que forneceu o financiamento.

Se nenhum financiamento tiver sido fornecido para a pesquisa, inclua a seguinte frase:

Esta pesquisa não recebeu nenhuma concessão específica de agências de financiamento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Fórmulas matemáticas: Por favor, submeta equações matemáticas como texto editável e não como imagens. Apresente fórmulas simples de acordo com o texto normal sempre que possível e use (/) em vez de uma linha horizontal para pequenos termos fracionários, por exemplo, X / Y . Em princípio, as variáveis devem ser apresentadas em itálico. Os poderes de e são frequentemente mais convenientemente denotados por exp. Numere consecutivamente as equações que devem ser exibidas separadamente do texto (se mencionadas explicitamente no texto).

Notas de rodapé devem ser usadas com moderação. Numere-os consecutivamente ao longo do artigo. Muitos processadores de texto criam notas de rodapé no texto e esse recurso pode ser usado. Se este não for o caso, indique a posição das notas de rodapé no texto e apresente as notas de rodapé separadamente no final do artigo.

Obra de arte

Pontos gerais da Arte eletrônica:

- Certifique-se de usar letras e tamanhos uniformes de sua arte original.
 - Fontes preferidas: Arial (ou Helvetica), Times New Roman (ou Times), Símbolo, Courier.
 - Numere as ilustrações de acordo com sua sequência no texto.
 - Use uma convenção de nomenclatura lógica para seus arquivos de ilustrações.
 - Indique por figura se é uma imagem de ajuste única, de 1,5 ou de 2 colunas.
 - Somente para envios de palavras, você ainda pode fornecer figuras e suas legendas e tabelas em um único arquivo no estágio de revisão.
 - Observe que os arquivos de figuras individuais maiores que 10 MB devem ser fornecidos em arquivos de origem separados.
- Um guia detalhado sobre arte eletrônica está disponível.

Formatos: independentemente da aplicação utilizada, quando o seu trabalho artístico eletrônico é finalizado, por favor 'salvar como' ou converter as imagens para um dos seguintes formatos (observe os requisitos de resolução para desenhos de linha, meios-tons e combinações de linha / meio-tom abaixo indicados):
EPS (ou PDF): desenhos vetoriais. Incorporar a fonte ou salvar o texto como 'gráficos'.
TIFF (ou JPG): Fotografias coloridas ou em tons de cinza (meios-tons): use sempre um mínimo de 300 dpi.

TIFF (ou JPG): Desenhos de linha de bitmap: use no mínimo 1.000 dpi.
TIFF (ou JPG): combina linhas / tons de bitmap (cores ou tons de cinza): é necessário um mínimo de 500 dpi.

Por favor não:

- Fornecer arquivos otimizados para uso na tela (por exemplo, GIF, BMP, PICT, WPG); a resolução é muito baixa.
- Forneça arquivos com resolução muito baixa.
- Envie gráficos que são desproporcionalmente grandes para o conteúdo.

Trabalho artístico colorido: Certifique-se de que os arquivos de trabalho artístico estejam em um formato aceitável (arquivos TIFF (ou JPEG), EPS (ou PDF) ou MS Office) e com a resolução correta. Se, juntamente com o seu artigo aceito, você enviar figuras em cores utilizáveis em seguida, Elsevier irá garantir, sem nenhum custo adicional, que estes números irão aparecer a cores on-line (por exemplo, ScienceDirect e outros sites), independentemente de haver ou não estas ilustrações são reproduzidas em cor na versão impressa. Para reprodução em cores impressa, você receberá informações sobre os custos da Elsevier após o recebimento do artigo aceito. Por favor, indique sua preferência por cor: impressa ou on-line. Mais informações sobre a preparação de arte eletrônica .

Legendas das figuras: Assegure-se de que cada ilustração tenha uma legenda. Uma legenda deve conter um breve título (não na própria figura) e uma descrição da ilustração. Mantenha o texto nas próprias ilustrações no mínimo, mas explique todos os símbolos e abreviações usadas.

Tabelas: Por favor, envie tabelas como texto editável e não como imagens. As tabelas podem ser colocadas ao lado do texto relevante no artigo ou em páginas separadas no final. Numere as tabelas consecutivamente de acordo com sua aparência no texto e coloque quaisquer notas de tabela abaixo do corpo da tabela. Seja poupado no uso de tabelas e garanta que os dados apresentados neles não dupliquem os resultados descritos em outra parte do artigo. Por favor, evite usar regras verticais e sombreamento nas células da tabela.

Referências:

Citação no texto: Certifique-se de que todas as referências citadas no texto também estejam presentes na lista de referências (e vice-versa). Quaisquer referências citadas no resumo devem ser dadas na íntegra. Resultados não publicados e comunicações pessoais não são recomendados na lista de referências, mas podem ser mencionados no texto. Se essas referências forem incluídas na lista de referências, elas devem seguir o estilo de referência padrão da revista e incluir uma substituição da data de publicação por "Resultados não publicados" ou "Comunicação pessoal". A citação de uma referência como 'in press' implica que o item foi aceito para publicação.

Links de referência: A maior capacidade de descoberta de pesquisas e a revisão por pares de alta qualidade são asseguradas por links on-line para as fontes citadas. Para nos permitir criar links para serviços de abstração e indexação, como Scopus, CrossRef e PubMed, assegure-se de que os dados fornecidos nas referências estejam corretos. Por favor, note que sobrenomes incorretos, títulos de periódicos / livros, ano de publicação e paginação podem impedir a criação de links. Ao copiar referências, tenha cuidado, pois elas já podem conter erros. O uso do DOI é incentivado.

Um DOI pode ser usado para citar e vincular a artigos eletrônicos onde um artigo é in-press e detalhes completos de citação ainda não são conhecidos, mas o artigo está disponível online. Um DOI é garantido para nunca mudar, então você pode usá-lo como um link permanente para qualquer artigo eletrônico. Um exemplo de uma citação usando o DOI para um artigo ainda não publicado é: VanDecar JC, Russo RM, James DE, Ambeh WB, Franke M. (2003). Continuação Aseismic da lajes de Lesser Antilles abaixo do nordeste da Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Por favor, note que o formato de tais citações deve estar no mesmo estilo de todas as outras referências no artigo.

Referências da Web: No mínimo, a URL completa deve ser fornecida e a data em que a referência foi acessada pela última vez. Qualquer informação adicional, se conhecida (DOI, nomes de autores, datas, referência a uma publicação de origem, etc.), também deve ser fornecida. As referências da Web podem ser listadas separadamente (por exemplo, após a lista de referências) sob um cabeçalho diferente, se desejado, ou podem ser incluídas na lista de referências.

Referências de dados: Esta revista encoraja-o a citar conjuntos de dados subjacentes ou relevantes no seu manuscrito, citando-os no seu texto e incluindo uma referência de dados na sua Lista de Referências. As referências de dados devem incluir os seguintes elementos: nome (s) do autor, título do conjunto de dados, repositório de dados, versão (quando disponível), ano e identificador global persistente. Adicione o [dataset] imediatamente antes da referência para que possamos identificá-lo corretamente como uma referência de dados. O identificador [dataset] não aparecerá em seu artigo publicado.

Referências em uma edição especial: Assegure-se de que as palavras "esta questão" sejam adicionadas a quaisquer referências na lista (e quaisquer citações no texto) a outros artigos na mesma Edição Especial.

Formatação de referência: Não há requisitos rígidos na formatação de referência no envio. As referências podem estar em qualquer estilo ou formato, desde que o estilo seja consistente. Quando aplicável, nome (s) do (s) autor (es), título do periódico / título do livro, título do capítulo / título do artigo, ano de publicação, número do volume / capítulo do livro e paginação devem estar presentes. O uso do DOI é altamente incentivado. O estilo de referência usado pela revista será aplicado ao artigo aceito pela Elsevier na etapa de prova. Observe que os dados ausentes serão destacados no estágio de prova para o autor corrigir. Se você deseja formatar as referências por conta própria, elas devem ser organizadas de acordo com os seguintes exemplos:

Estilo de referência

Texto: Todas as citações no texto devem referir-se a:

1. *Autor único:* o nome do autor (sem iniciais, a menos que haja ambiguidade) e o ano de publicação;
2. *Dois autores:* os nomes dos autores e o ano de publicação;
3. *Três ou mais autores:* nome do primeiro autor seguido de "et al." e o ano da publicação.

As citações podem ser feitas diretamente (ou entre parênteses). Grupos de referências devem ser listados primeiro em ordem alfabética, depois em ordem cronológica.

Exemplos: 'como demonstrado (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan e Jones, 1999). Kramer et al. (2010) mostraram recentemente ...'

Lista: As referências devem ser organizadas primeiro em ordem alfabética e depois classificadas cronologicamente, se necessário. Mais de uma referência do (s) mesmo (s)

autor (es) no mesmo ano deve ser identificada pelas letras 'a', 'b', 'c' etc., colocadas após o ano de publicação.

Exemplos:

Referência a uma publicação de revista:
Van der Geer, J., Hanraads, JAJ, Lupton, RA, 2010. A arte de escrever um artigo científico. J. Sci. Comum. 163, 51-59.

Referência a um livro:
Strunk Jr., W., White, EB, 2000. The Elements of Style, quarta ed. Longman, Nova York.

Referência a um capítulo de um livro editado:
Mettam, GR, Adams, LB, 2009. Como preparar uma versão eletrônica de seu artigo, em: Jones, BS, Smith, RZ (Eds.), Introdução à Era Eletrônica. E-Publishing Inc., Nova Iorque, pp. 281-304.

Referência a um site:
Cancer Research UK, 1975. Relatórios de estatísticas de câncer para o Reino Unido. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (acessado em 13 de março de 2003).

Referência a um conjunto de dados:
[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Dados de mortalidade para a doença de murchar japonesa e composições florestais circundantes. Dados Mendeley, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.