

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

JULIANA MACHADO MALTA

Avaliação dos efeitos do anticorpo anti-fosfolipase A₂ (IgY anti-BnSP-7) em diferentes etapas da progressão tumoral em células tumorais de próstata PC-3

Uberlândia

2023

JULIANA MACHADO MALTA

Avaliação dos efeitos do anticorpo anti-fosfolipase A₂ (IgY anti-BnSP-7) em diferentes etapas da progressão tumoral em células tumorais de próstata PC-3

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como pré-requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia pelo curso de Biotecnologia
da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Profa. Dra. Veridiana de Melo
Rodrigues Ávila

Co-orientadora: Dra. Tássia Rafaella Costa

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Machado Malta

Avaliação dos efeitos do anticorpo anti-fosfolipase A₂ (IgY anti-BnSP-7) em diferentes etapas da progressão tumoral em células tumorais de próstata PC-3

Data: 29 / 06 / 2023

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pelo curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-orientadora: Dra. Tássia Rafaella Costa

Banca Examinadora

(Orientadora) Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (Instituto de Biotecnologia)

Dra. Lorena Polloni

Instituição: Pesquisadora do Núcleo de Estudo e Pesquisa Oncológica do Grupo Luta pela Vida; Pós- doutoranda pelo Programa de Parasitologia e Imunologia Aplicadas (UFU- ICBIM)

Prof. Dra. Renata Santos Rodrigues

Instituição: Instituto de Biotecnologia, UFU- IBTEC

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, por todas as oportunidades e incentivos ao longo da minha jornada pessoal e profissional. Vocês são a minha fortaleza.

Agradeço aos meus amigos que estiveram comigo durante a graduação e aos que fiz durante o treinamento no LaBiTox, principalmente à Lorena Moraes e ao Vinícius, que me auxiliaram na reta final desse trabalho. Vocês fizeram diferença no meu dia-a-dia, me deram apoio emocional e tornaram cada desafio mais leve.

Agradeço ao Henrique, que esteve comigo em todos os momentos, dentro e fora do curso. Agradeço ao Otávio, pelo companheirismo e por acreditar em mim, quando nem eu mesma acreditava. O apoio de vocês foi fundamental.

Agradeço imensamente à Profa. Dra. Veridiana, por todo o ensinamento, orientação e carinho que recebi durante a realização desse trabalho. Você é minha inspiração como mulher e cientista.

Agradecimento especial à minha coorientadora Dra. Tássia, por ter se tornado uma amiga tão querida e especial. Trabalhar com você foi e sempre será uma honra.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia e ao CNPq pela oportunidade e apoio para realizar esse trabalho.

Obrigada por fazerem parte da minha história!

RESUMO

MALTA, J. M. **Avaliação dos efeitos do anticorpo anti-fosfolipase A₂ (IgY anti-BnSP-7) em diferentes etapas da progressão tumoral em células tumorais de próstata PC-3.** 2023. p40. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) – Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

O câncer de próstata (CaP) está entre os principais tipos de câncer entre a população masculina, sendo um significativo fator que leva tal população à morte quando é diagnosticado tardiamente. Devido à heterogeneidade dessa doença, o desenvolvimento de novos tratamentos é imprescindível. As fosfolipases A₂ (PLA₂) são enzimas essenciais no metabolismo de fosfolipídeos e estão envolvidas em uma série de fisiopatologias, como o câncer. Recentemente, as PLA₂ vem sendo reconhecidas como possíveis biomarcadores, tendo em vista sua expressão aberrante em diversos tipos de câncer, como no de próstata. Essa enzima possui papel carcinogênico em virtude da produção de eicosanóides, os quais medeiam efeitos pró-tumorais, como proliferação, resistência à apoptose, transformação e metástase. Ainda, estão envolvidas na inflamação, um evento pró-tumoral. No presente trabalho, avaliamos o potencial citotóxico de anticorpos policlonais anti-PLA₂ produzidos em galinhas previamente imunizadas com BnSP-7, uma fosfolipase A₂ homóloga isolada da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*, frente a células tumorais de próstata PC-3. A purificação desses anticorpos foi realizada com êxito por meio da cromatografia de afinidade em coluna HiTrap IgY HP. Ensaios de ELISA demonstraram a capacidade do anticorpo de reconhecer seu próprio antígeno (BnSP-7), assim como PLA₂ isoladas (BthTX-I e BthTX-II) e PLA₂ presentes na peçonha de serpentes *B. pauloensis* e *B. jararacussu*. Ensaios de citotoxicidade avaliados em 24 e 48h demonstraram que o IgY anti-BnSP-7 possui baixa citotoxicidade nas células PC-3. Buscando averiguar se esse anticorpo poderia influenciar em outras etapas na tumorigênese, avaliamos a capacidade deste inibir processos como adesão e migração celular. O anticorpo IgY anti-BnSP-7 não foi capaz de inibir a adesão das células PC-3 nos componentes da matriz extracelular, entretanto, inibiu a migração celular. Novos ensaios são necessários para elucidar o mecanismo de ação dessa molécula. Por fim, esses resultados sugerem que a inibição de PLA₂ por anticorpos é uma ferramenta biotecnológica potencial para terapias anti-câncer.

Palavras-chave: Anticorpo IgY; câncer de próstata; fosfolipase A₂.

ABSTRACT

MALTA, J. M. **Evaluation of the effects of anti-phospholipase A₂ antibodies (IgY anti-BnSP-7) in different stages of tumor progression in PC-3 prostate cancer cells.** 2023. p40. Final paper (Monography) – Institute of Biotechnology, Uberlandia Federal University, Minas Gerais, Brazil.

Prostate cancer (PCa) is among the main types of cancer between the male population, being a significant factor that leads this population to death, when late diagnosed. Due to the heterogeneity of this disease, the design of new treatments is essential. Phospholipases A₂ (PLA₂) are essential enzymes in the metabolism of phospholipids and are involved in several pathophysiologies, such as cancer. Recently, PLA₂ has been recognized as possible biomarker, in view of its aberrant expression in several types of cancer, such as prostate cancer. This enzyme has a carcinogenic role due to the production of eicosanoids, which mediate pro-tumor effects, such as proliferation, resistance to apoptosis, transformation and metastasis. Furthermore, they are involved in inflammation, a pro-tumor event. Herein, we evaluated the cytotoxic potential of anti-PLA₂ polyclonal antibodies produced in chickens previously immunized with BnSP-7, a homologous phospholipase A₂ isolated from the *Bothrops pauloensis* venom, against prostate tumor cells PC-3. The purification of these antibodies was successfully performed using affinity chromatography on a HiTrap IgY HP column. ELISA assays demonstrated the ability of the antibody to recognize its own antigen (BnSP-7), as well as isolated homologous PLA₂ (BthTX-I and BthTX-II) and PLA₂ present in the venom of *B. pauloensis* and *B. jararacussu* snakes. Cytotoxicity assays evaluated at 24 and 48h demonstrated that anti-BnSP-7 IgY has low cytotoxicity in PC-3 cells. Seeking to find out if this antibody could influence other stages in tumorigenesis, we evaluated the ability to inhibit adhesion and migration. Anti-BnSP-7 IgY was not able to inhibit PC-3 cell adhesion to extracellular matrix components, however, it inhibited cell migration. New assays are needed to elucidate the mechanism of action of this molecule. Taken together, these results suggest that PLA₂ inhibition by antibodies is a potential biotechnological tool for anti-cancer therapies.

Keywords: IgY antibodies; phospholipase A₂; prostate cancer.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1.O câncer de próstata: Etiologia, fisiopatologia e tratamento	7
1.2 Fosfolipases: e sua relação com o câncer	9
1.3 PLA ₂ BnSP-7 e o potencial terapêutico do anticorpo IgY anti-BnSP-7	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 Obtenção das peçonhas e toxinas	15
3.2 Imunização de galinhas.....	16
3.3 Obtenção da fração proteica e isolamento de IgYs.....	17
3.4 Quantificação proteica	17
3.5 Avaliação da homogeneidade do anticorpo	18
3.6 Avaliação do reconhecimento e especificidade dos anticorpos.....	18
3.7 Análise do potencial citotóxico do anticorpo IgY anti-BnSP-7 frente a linhagem tumoral de próstata PC-3	19
3.7.1. Manutenção das células e linhagem celular	19
3.7.2 Ensaio de viabilidade celular.....	20
3.7.3 Ensaio de adesão celular	20
3.7.4 Ensaio de <i>wound healing</i>	20
3.7.5 Ensaio de migração celular por <i>transwell</i>	21
3.8. Análise estatística	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Purificação de IgY	22
4.2. O anticorpo IgY anti-BnSP-7 apresenta reatividade cruzada sobre PLA ₂ em diferentes peçonhas botrópicas	25
4.3. O anticorpo IgY anti-BnSP-7 é capaz de reconhecer a toxina BnSP-7 em diferentes concentrações.....	27
4.4. O anticorpo IgY anti-BnSP-7 afeta parcialmente a progressão tumoral	28
5. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. O câncer de próstata: Etiologia, fisiopatologia e tratamento

O termo câncer abrange mais de cem doenças, as quais possuem em comum o crescimento desordenado de células, o que pode ser causado por fatores genéticos e ambientais (INCA, 2022). Essa proliferação exacerbada é resultado do acúmulo de diversas mutações no DNA, que levam a ativação de proto-oncogenes e inativação de genes de supressão tumoral (TERMINI *et al.*, 2020).

Além disso, em busca de determinar um parâmetro dos diferentes tipos de tumores sob óptica fenotípica, foi proposto pela área da oncologia molecular algumas características denominadas de marcas do câncer (do inglês, *Hallmarks of cancer*), as quais são um conjunto de capacidades funcionais essenciais para formar tumores malignos, adquiridas pelas células à medida que se tornam células neoplásicas. Atualmente, são descritas catorze *hallmarks* (Figura 1) que compreendem a habilidade adquirida para sustentar a sinalização proliferativa, evadir supressores de crescimento, resistir à morte celular, permitir a imortalidade replicativa, induzir angiogênese, ativar invasão e metástase, reprogramar o metabolismo celular, evadir do sistema imunológico, instabilidade genômica, inflamação promovida pelo tumor, reprogramação epigenética não mutacional, senescência celular, desbloqueio da plasticidade fenotípica e microbiomas polimórficos (HANAHAN, 2022).

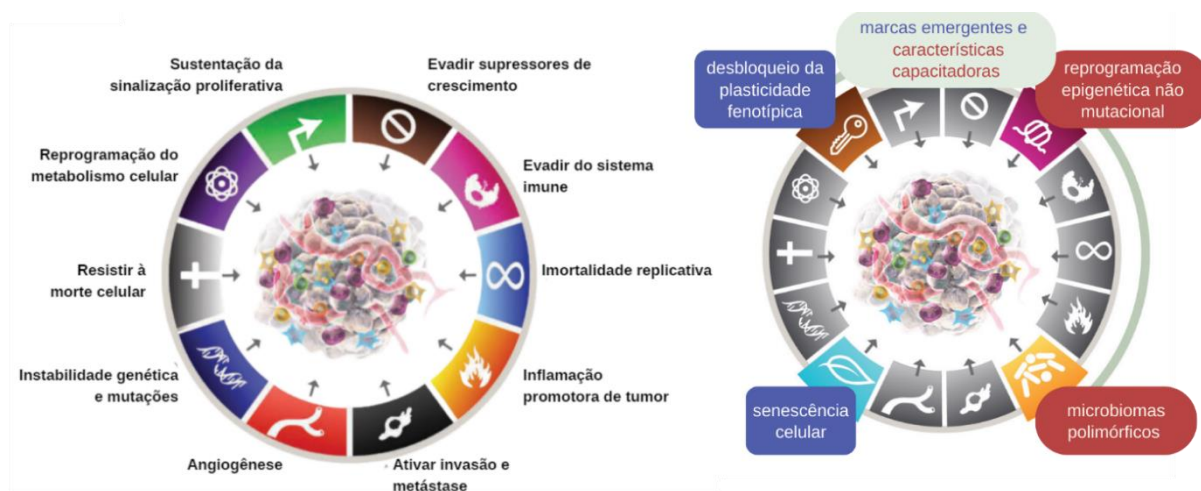


Figura 1: *Hallmarks of cancer*. Fonte: HANAHAN, 2022 (adaptado).

Os diferentes tipos de câncer correspondem à variabilidade celular, podendo ser classificado como carcinoma (quando começam em tecidos epiteliais) e sarcoma (quando começam em tecidos conjuntivos) (INCA, 2022). O câncer de próstata (CaP) é caracterizado como um carcinoma que afeta o epitélio da próstata em homens. Acredita-se que as células iniciadoras de um adenocarcinoma prostático se originam das

células epiteliais basais ou luminais da próstata, assim, o epitélio transformado deve possuir a capacidade de invadir a membrana basal para ser classificado como cancerígeno (SANDHU *et al.*, 2021).

A próstata é um acessório do órgão reprodutor masculino, localizado abaixo da bexiga e ao redor da uretra. Tem como principal função contribuir com secreções essenciais para o sêmen, que formula o ejaculado e mantém a viabilidade do esperma (REBELLO *et al.*, 2021). As manifestações clínicas mais comuns dessa doença são: dificuldade de urinar, demora em iniciar ou finalizar o jato urinário, diminuição do jato urinário, necessidade de urinar mais vezes durante o dia ou à noite e presença de sangue na urina (BRASIL, 2022).

No Brasil, o câncer de próstata é o tipo mais comum de câncer entre a população masculina, estimando cerca de 65 mil casos em 2022, pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) (INCA, 2022). O risco de desenvolver CaP aumenta fortemente com o avanço da idade, sendo mais incidente em homens acima de 60 anos (REBELLO *et al.*, 2021). Além disso, etnia e histórico familiar também são fatores de risco bem definidos. As taxas de incidência são maiores em homens de descendência afro-americana do que em homens brancos, sendo que o aumento da mortalidade e agressividade estão associados à etnia afro-americana (SATHIANATHEN *et al.*, 2018). O histórico familiar possui relação com a pré-disposição genética, de modo que mutações germinativas em genes de reparo do DNA, como BRCA1, BRCA2 e HOXB13 podem conferir maiores riscos de CaP precoce (<60 anos) (REBELLO *et al.*, 2021).

O CaP pode ser classificado como andrógeno sensível ou insensível, que indica sua capacidade de responder a testosterona, podendo encaminhar para o melhor tratamento (SEKHOACHA *et al.*, 2022). Andrógenos e receptores de andrógeno (AR) regulam o desenvolvimento e crescimento normais da próstata. A ligação andrógeno-receptor forma um complexo que, associado a proteínas translocadoras do núcleo, se liga à sequência consenso de elementos de resposta androgênica (AREs) e regula a expressão de genes responsivos androgênicos (ARGs) (YANG *et al.*, 2005). Condições que alterem a sinalização da via androgênica, como amplificação/mutações de AR, ganho de coativadores de AR, perda de co-repressores AR, vias de sinalização independentes de androgênio, podem levar ou serem resultados do desenvolvimento de CaP refratário a andrógenos (WANG, GUOCAN *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2005).

Nesse sentido, a terapia de ablação androgênica é utilizada como uma alternativa de tratamento CaP andrógeno sensível. No entanto, a maioria dos pacientes

que demonstraram uma resposta inicial favorável a esse tratamento, eventualmente tornam-se refratários a ele (RITCH; COOKSON, 2018; YANG *et al.*, 2005). Uma vez que o paciente desenvolve tumor andrógeno resistente, aumentam as chances de morte relacionadas ao CaP (TEO; RATHKOPF; KANTOFF, 2019).

Ligado a isso, o rastreamento de CaP é a principal forma de detectá-lo em indivíduos assintomáticos, aumentando as chances de cura (REBELLO *et al.*, 2021). O Escore de Gleason é um dos prognósticos mais utilizados e se baseia na aparência histológica das células do CaP, na extensão da diferenciação glandular e no padrão de crescimento no estroma prostático (SATHIANATHEN *et al.*, 2018). Esse sistema de pontuação é definido como a soma de dois padrões mais representativos da neoplasia, na qual 6 é considerado menos agressivo e mais diferenciado e 10 é considerado o mais agressivo e menos diferenciado (EPSTEIN, 2018). Ademais, o diagnóstico pode ser realizado por biópsia, teste de antígeno específico da próstata (PSA), exame de toque retal e ressonância magnética (MRI) (SEKHOACHA *et al.*, 2022).

Estudos prévios demonstraram aumento na expressão de fosfolipases A₂ em carcinomas de grau 2-4 de Gleason, quando comparado a tumores benignos de próstata, além de que, a expressão de PLA₂ em tumores primários é maior do que em tumores metastáticos, e, portanto, PLA₂ podem ser utilizadas como marcadores de carcinomas de próstata altamente proliferativos e pouco diferenciados (MIRTTI *et al.*, 2009; PENG *et al.*, 2021). Além do CaP, as fosfolipases também foram descritas como superexpressas e altamente ativas em cânceres de mama (YAMASHITA *et al.*, 1994), pulmão (BENNETT *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2012), pâncreas (KIYOHARA *et al.*, 1993), fígado (YING *et al.*, 1994) e pele (YAMASHITA *et al.*, 1994).

1.2 Fosfolipases: e sua relação com o câncer

As fosfolipases são enzimas essenciais ao metabolismo de fosfolipídeos e participam na manutenção e regulação da membrana lipídica, bem como da sua composição, além de atuarem na digestão, inflamação, e uma série de desordens cardiovasculares e também com diferentes tipos de cânceres (FILKIN *et al.*, 2020; PENG *et al.*, 2021). Essas enzimas são classificadas em quatro grandes famílias (A, B, C e D), de acordo com o sítio de clivagem no fosfolipídeo (**Figura 2**) (FILKIN *et al.*, 2020). As fosfolipases A₁ (PLA₁), fosfolipases A₂ (PLA₂) e fosfolipases B (PLB), são acetil-

hidrolases; enquanto as fosfolipases C e D (PLC, PLD) são fosfodiesterases (ALOULOU *et al.*, 2018).

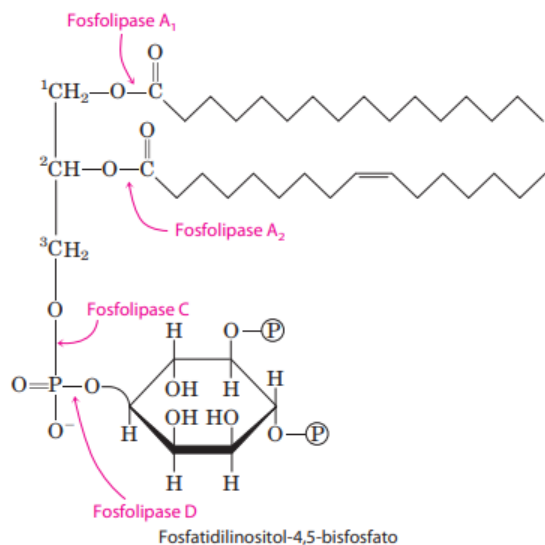


Figura 2: Sítios de clivagem para diferentes fosfolipases na molécula de fosfolípido. Fonte: LEHNINGER *et al.*, 2014.

Baseado na sequência, massa molecular, localização, função, quantidade de ligações dissulfeto, especificidade do substrato e necessidade de cálcio, as PLA₂s são classificadas em: secretoras (sPLA₂), citosólicas (cPLA₂), independentes de Ca²⁺ (iPLA₂), lisossômicas (LPLA₂), fator ativador de plaquetas acetil-hidrolase (PAF-AH), PLA/aciltransferase (PLAAT), α/β hidrolase (ABHD) e PLA₂ específicas para glicosilfosfatidilinositol (GPI) (DENNIS *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2020; MURAKAMI; SATO; TAKETOMI, 2020). Essas enzimas são responsáveis por hidrolisar glicerofosfolípeos na posição sn-2 da ligação éster, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolípeos. Esses metabólitos ativam a produção de mediadores lipídicos, como eicosanóides. Além disso, essas enzimas participam da homeostase da membrana, alterando a composição de fosfolípeos; na produção de energia ao fornecer ácidos graxos para a β-oxidação; na geração de lípeos de barreira, na manutenção do equilíbrio entre ácidos graxos saturados e insaturados; entre outros (MURAKAMI; SATO; TAKETOMI, 2020).

As sPLA₂ são, ainda, subdivididas em grupos IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII, e XIV (FILKIN *et al.*, 2020). Estão presentes em altas concentrações na peçonha de serpentes, abelhas e vespas, além de estarem presentes em vários órgãos, células e no suco pancreático de mamíferos (MOREIRA *et al.*, 2021). Dentre esses grupos, destacam-se as PLA₂s do grupo I e II, que correspondem

às enzimas secretadas encontradas na peçonha de serpentes Elapidae e Viperidae, respectivamente (MOREIRA *et al.*, 2021). Essas enzimas são proteínas com massa molecular de ~14 kDa e requerem concentrações milimolares de Ca^{2+} para exercerem atividade catalítica (FILKIN *et al.*, 2020). Além disso, podem ser subdivididas em subgrupos embasados, principalmente, em apresentar atividade catalítica. As Asp49 PLA₂ possuem ácido aspártico conservado na posição 49, sendo cataliticamente ativas, enquanto as Lys49 PLA₂, por possuírem lisina nessa posição, são cataliticamente inativas, em virtude de sua incapacidade de coordenar ao cofator Ca^{2+} (HAAS, 1988).

As fosfolipases A₂ vêm sendo relacionadas a tumorigênese e a progressão tumoral, tendo um importante papel pró-tumoral no câncer de próstata, além de serem superexpressas nesse tipo tumoral (JIANG *et al.*, 2002). Essas enzimas são responsáveis pela hidrólise de glicerofosfolipídeos, formando lisofosfolipídeos e ácidos graxos livres. Caso o ácido graxo livre liberado seja o ácido araquidônico, o mesmo pode ser metabolizado por múltiplas enzimas em diferentes moléculas, as quais podem induzir carcinogênese. O ácido araquidônico pode ser substrato para ciclooxigenases (COX), lipoxigenases (LOX) e citocromo P450 (CYP450), produzindo eicosanóides como leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos (CUMMINGS, 2007).

Por conseguinte, a expressão exacerbada de PLA₂s leva ao aumento de eicosanóides, os quais medeiam efeitos pró-tumorais, como proliferação, resistência à apoptose, transformação e metástase (PENG *et al.*, 2021). Esses metabólitos, ativam receptores acoplados à proteína G, promovendo a transcrição, síntese e liberação de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucinas (ILs), induzindo a expressão de genes NF- κ B-dependente (ALBERGHINA, 2010). A ativação de NF- κ B e sua translocação para o núcleo, estimula a expressão de fosfolipases, aumentando a liberação de eicosanóides (PENG *et al.*, 2021). A liberação de fatores de crescimento é imprescindível para os processos de metástase e angiogênese. Nesse sentido, as prostaglandinas estimulam a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que, ao se ligarem ao seu receptor, resulta na ativação da via PKC α -MEK-ERK1/2 e PI3K/Akt, induzindo a ativação de NF- κ B e fosfolipases, além da síntese de derivados do ácido araquidônico (ALBERGHINA, 2010; DONG *et al.*, 2010). Ademais, estimula a fosforilação dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR), promovendo a angiogênese (WANG *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2012).

Acredita-se que a inflamação crônica e infecções urinárias levam a carcinogênese por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), causando

instabilidade genômica e, assim, facilitando a ocorrência de mutações (SANDHU *et al.*, 2021). Ainda, a inflamação leva a produção de fatores de crescimento e citocinas que estimulam a expansão celular, aumentando a chance do desenvolvimento e disseminação de mutações; e a ativação de vias de sinalização, que levam a eventos epigenéticos que podem regular a expressão gênica favorecendo a iniciação do tumor (B. VENDRAMINI-COSTA; E. CARVALHO, 2012). Com esse ambiente, há um aumento da proliferação de células epiteliais luminiais da próstata de fenótipo intermediário, que pode ser propenso a alterações epigenéticas e genômicas, levando a neoplasias e transformações malignas (SANDHU *et al.*, 2021). As células tumorais produzem citocinas e quimiocinas que atraem outras células inflamatórias para o microambiente, facilitando o desenvolvimento tumoral. Além disso, a inflamação contribui para a indução de angiogênese, migração e invasão (B. VENDRAMINI-COSTA; E. CARVALHO, 2012; PENG *et al.*, 2021; VECCHI *et al.*, 2021). Diante do exposto, moléculas capazes de inibir PLA₂ são moléculas com grande potencial anti-cancerígeno, podendo inibir processos proliferativos, angiogênicos e metastáticos.

1.3 PLA₂ BnSP-7 e o potencial terapêutico do anticorpo IgY anti-BnSP-7

A PLA₂ BnSP-7 foi a primeira fosfolipase A₂ isolada e caracterizada da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (RODRIGUES, *et al.*, 1998). Essa toxina é uma Lys49, sendo assim, cataliticamente inativa. Possui massa molecular em torno de 14 kDa e ponto isoelétrico de 8,8. Em relação a sua estrutura, a BnSP-7 é dimérica (**Figura 3**) (MADEJ T *et al.*, 2014) e semelhante a outras Lys49 PLA₂, consistindo em sete interações dissulfeto e elementos estruturais secundários conservados. Sua estrutura tridimensional é composta por uma α -hélice N-terminal, um loop de ligação Ca²⁺, duas α -hélices antiparalelas 2 e 3, uma folha- β anti-paralela e região C-terminal (MAGRO *et al.*, 2003).

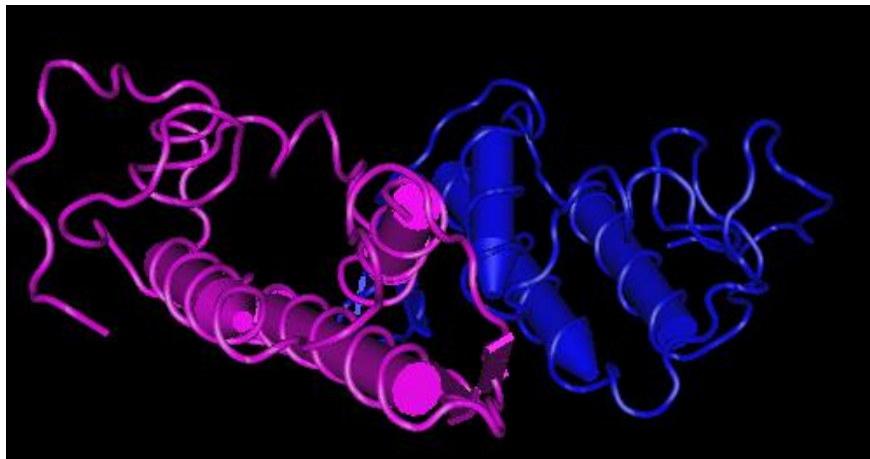


Figura 3: Estrutura tridimensional da BnSP-7. Em roxo: cadeia A e em azul: cadeia B. Fonte: MADEJ T *et al.*, 2014).

Estudos pioneiros realizados por nosso grupo de pesquisa com a BnSP-7, demonstraram a capacidade de anticorpos policlonais IgY anti-PLA₂ de *Bothrops pauloensis* de reconhecerem alvos proteicos de *Leishmania leishmania amazonensis* e *Toxoplasma gondii*, e seus efeitos citotóxicos e anti-proliferativos sobre formas promastigotas dos parasitos (BORGES, 2019). Este trabalho viabilizou os anticorpos anti-PLA₂ produzidos em galinhas como uma ferramenta potencial para inibir efeitos parasitários, por serem capazes de reconhecer proteínas do parasito e por exercerem ação citotóxica e antiproliferativa. Pesquisas que demonstrem o potencial terapêutico dos anticorpos IgY anti-PLA₂ podem abrir caminhos para novas abordagens para complementar terapias já existentes para o câncer e doenças parasitárias.

A imunoglobulina Y (IgY, sendo “Y” utilizado para representar a nomenclatura em inglês para gema de ovo (“yolk”), onde estão presentes esses anticorpos) é produzida por aves, répteis, anfíbios e peixes pulmonados e é equivalente à IgG em mamíferos. Entretanto, apresentam diferenças estruturais e funcionais, como maior tamanho da cadeia pesada IgY. Ambos são compostos por duas cadeias leves (L), com 25 kDa, e duas cadeias pesadas (H), cada uma com peso molecular entre 67 e 70 kDa. As cadeias leves possuem uma região constante, denominada CL e uma região variável, denominada VL. No entanto, a grande diferença entre essas imunoglobulinas está na cadeia pesada: o IgG possui três regiões constantes na cadeia pesada (CH1- CH3), enquanto o IgY possui quatro regiões constantes (CH1-CH4) (**Figura 4**) (MICHAEL *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2019).

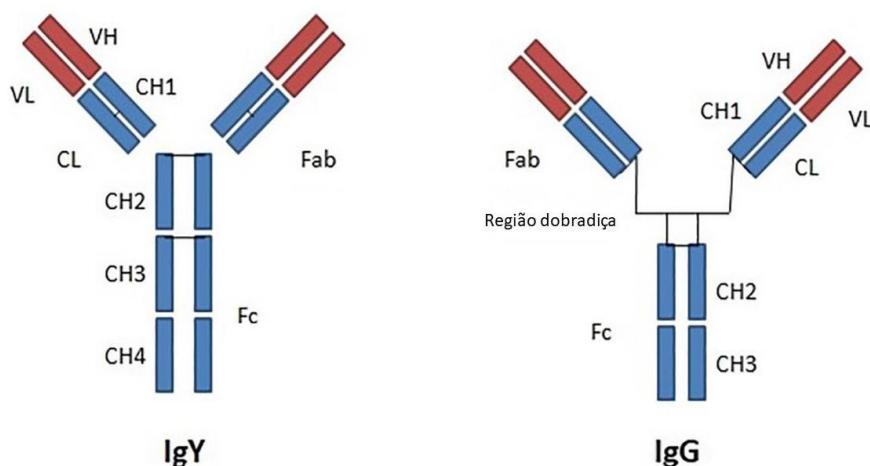


Figura 4: Estrutura do IgY e IgG. V= região variável da cadeia leve (VL) e da cadeia pesada (VH); C= região constante da cadeia leve (CL) e da cadeia pesada (CH). Fonte: PEREIRA *et al.*, 2019 (adaptado)

O IgY não possui uma região dobradiça entre CH1 e CH2, tornando-o menos flexível do que o IgG (MICHAEL *et al.*, 2010). Por conseguinte, apresenta maior resistência à degradação proteolítica e é mais específico, além de que é capaz de manter sua estrutura estável a um pH entre 3,5 -11,0 e entre 30°-70°C. Quando purificado, pode ser preservado por até um mês em temperatura ambiente e por anos a 4°C, assim, pode representar uma ferramenta biotecnológica vantajosa no diagnóstico e tratamento (LEÓN-NÚÑEZ *et al.*, 2022).

A produção de anticorpos por galinhas, em paralelo a produção em mamíferos, especialmente em pequenos roedores, simboliza a redução e o refinamento na utilização de animais. As galinhas poedeiras ovipõe cerca de 300 ovos por ano, sendo capaz de produzir cerca de 20g de IgY total/ano com base em um conteúdo médio de IgY de 60mg por ovo (PAULY *et al.*, 2011). Dessa maneira, uma galinha imunizada produz, por ano, o equivalente a produção de 4.3 coelhos, possibilitando a redução no número de animais necessários (XU *et al.*, 2011). Ademais, a extração dos anticorpos da gema dos ovos substitui a coleta de sangue, o que diminui o estresse animal (KARLSSON *et al.*, 2004).

A tecnologia do IgY proporciona maior produção de anticorpos específicos a baixo custo. Além disso, apresentam vantagens sobre o IgG, visto que produz uma resposta imune mais forte contra epítopos de proteínas de mamíferos conservadas; menor reatividade cruzada; evita a ativação do sistema complemento humano; sua porção Fc é incapaz de se ligar ao fator reumatoide, reduzindo falsos

positivos e não há efeitos colaterais tóxicos relatados para usos terapêuticos (KARLSSON *et.al*, 2004; LEÓN-NÚÑEZ *et al.*, 2022).

Por fim, os anticorpos policlonais IgY têm sido utilizados com sucesso em diversas aplicações biotecnológicas, como em imunodiagnóstico, imunoterapias, neutralização de toxinas de animais peçonhentos, atividade antibactericida, antitumoral e antiparasitária (BORGES *et al.*, 2018; LEÓN-NÚÑEZ *et al.*, 2022; PEREIRA *et al.*, 2019). Nesse cenário, IgY anti-PLA₂s de peçonhas de serpentes demonstram potencial terapêutico para complementar terapias já existentes para o câncer.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico de anticorpos policlonais anti-PLA₂ produzidos em galinhas previamente imunizadas com BnSP-7, uma fosfolipase A₂ homóloga isolada da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*, frente a células tumorais de próstata PC-3.

2.2 Objetivos específicos

- Purificar anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7 e IgY PBS por cromatografia de afinidade;
- Avaliar a homogeneidade das amostras isoladas por eletroforese em SDS-PAGE;
- Avaliar a imunorreatividade desses anticorpos frente a diferentes peçonhas e fosfolipases A₂ isoladas por ensaio de ELISA;
- Avaliar a citotoxicidade dos anticorpos anti-PLA₂ frente à linhagem tumoral de próstata humana PC-3 pelo método de MTT;
- Avaliar o potencial inibitório dos anticorpos anti-PLA₂ frente a progressão tumoral, por meio de ensaios de migração e adesão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das peçonhas e toxinas

As fosfolipases A₂ (BnSP-7) de *Bothrops pauloensis*, (BthTx-I e BthTx-II) de *Bothrops jararacussu*, e a L-aminoácido oxidase de *Bothrops moojeni* (Pollonei-

LAAO) foram obtidas do Banco de Toxinas e Peçonhas do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LaBiTOX) do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. As peçonhas de *B. pauloensis* e *B. jararacussu* foram previamente adquiridas a partir de espécimes mantidas no Serpentário CETA- Centro de Extração de Toxinas Animais Ltda - CNPJ: 08.972.260/0001-30, estabelecido na estrada municipal Couto e Silvas - Sítio São Jorge Silvas - Morungaba, SP - CEP: 13260-000. Este serpentário possui comprovante de registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (cadastro: 2087163).

3.2 Imunização de galinhas

A indução da produção de anticorpo policlonal IgY anti-fosfolipase A₂ foi realizada a partir da imunização de galinhas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*) com a toxina BnSP-7 de *B. pauloensis*, em colaboração com o Prof. Dr. Álvaro Ferreira Júnior, da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, o qual é coordenador do projeto de pesquisa “Desenvolvimento de imunobiológicos IgY contra alvos antigênicos da peçonha botrópica e do extrato solúvel de protozoários de importância em saúde pública”. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/ CEUA (UFG) com o número de protocolo 113/19. As galinhas poedeiras de 25 semanas de idade, peso aproximado de 1,6 Kg, foram mantidas em gaiolas de metal (40x40x50cm) individuais, recebendo água e ração balanceada. Ao final dos ensaios, as galinhas foram eutanasiadas via injeção endovenosa de uma mistura de quetamina/ xilazina, seguida de deslocamento cervical. As carcaças foram encaminhadas ao forno crematório do Setor de Patologia do DMV-UFG.

O protocolo de imunização foi realizado como descrito por Borges et al., 2019. Assim, as imunizações foram realizadas em dois grupos, sendo um com BnSP-7 e o outro com PBS (grupo controle). O primeiro grupo (n=2) recebeu quatro imunizações de 50µg de antígeno (BnSP-7) por inoculação, sendo a primeira com adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich Co., EUA), seguida por 3 booster (BnSP-7 + adjuvante incompleto). Para o grupo controle (n=2), foi inoculado 250µL de PBS (0,01M). Ambas

imunizações foram administradas por via intramuscular com intervalos de 14 dias entre as inoculações.

3.3 Obtenção da fração proteica e isolamento de IgYs

As gemas de ovos coletadas das galinhas imunizadas com a PLA₂ BnSP-7 e tratadas com PBS foram diluídas em água deionizada, homogeneizadas *overnight* e centrifugadas a 800 xg durante 40 min a 4°C, formando um *pellet* rico em lipídeos. Em seguida, o sobrenadante foi precipitado com sulfato de amônio 20% (Sigma-Aldrich Co., EUA) e centrifugado (2000×g, 25 min, 4°C). O *pellet* rico em IgY foi coletado e ressuspenso em PBS (1:10 volume inicial). Por fim, a amostra foi liofilizada e armazenada em alíquotas de 10mg mantidas a -20°C até sua posterior utilização.

As alíquotas contendo uma solução rica em IgY (10 mg) foram solubilizadas em 550µL do tampão de ligação (fosfato de sódio monobásico 0,02M; sulfato de potássio 0,5M; pH 7,4) e, em seguida, foram fracionadas em uma coluna HiTrap IgY HP (Cytiva; 16 x 25 mm; 5 mL), previamente equilibrada com 25 mL do mesmo tampão. Os anticorpos IgY foram eluídos utilizando um gradiente linear de tampão de fosfato de sódio 0,02M, pH 7,5, com fluxo 1mL/min no sistema ÄKTA prime plus FPLC (GE Healthcare). As frações (2mL) foram coletadas e a leitura da absorbância foi feita a 280nm (BioDrop, UK). De acordo com o perfil cromatográfico, as frações foram agrupadas e concentradas por ultrafiltração usando Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter (MWCO = 30,000) (Millipore, MA, EUA) para mudança do tampão inicial (fosfato de sódio monobásico 0,02M; sulfato de potássio 0,5M; pH 7,4) para água ultrapura pH 7,4, visando a eliminação do sal residual. A fração contendo IgY (anti-BnSP-7) foi liofilizada e mantida a -20°C até sua utilização em ensaios posteriores.

3.4 Quantificação proteica

A concentração do anticorpo IgY nas amostras foram determinadas pelo método descrito por Bradford (1976), com modificações. A dosagem foi realizada em placas de 96 poços onde cada amostra foi incubada com 150 µL de reagente de Bradford (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) por 10 minutos em temperatura ambiente e a leitura da densidade óptica medida a 595 nm no espectrofotômetro Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific). Para quantificar a

concentração proteica da amostra por regressão linear, utilizou-se uma curva padrão de soroalbumina bovina (2mg/mL) (Thermo Fischer Scientific).

3.5 Avaliação da homogeneidade do anticorpo

A homogeneidade da amostra contendo os anticorpos IgY foi avaliada por eletroforese em SDS-PAGE a 12,5% (m/v) em condições redutoras, na presença de SDS e β -mercaptoetanol, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970), com modificações. O sistema de SDS-PAGE descontínuo foi construído com um gel de empilhamento a 3%, contendo Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) e SDS a 0,1% (m/v) e um gel de separação a 12,5% contendo Tris-HCl 2,0M (pH 8,8) e SDS a 0,1% (m/v), mantendo a proporção de 0,8:30 de bis:acrilamida. O gel foi preparado em sistema de eletroforese Hoefer SE 260 Mighty Small II Mini-Vertical (Hoefer Inc, MA, EUA). As amostras foram dispersas em Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, azul de bromofenol 0,01% (m/v), glicerol 10% (v/v) e β -mercaptoetanol 20% (v/v). O tampão do eletrodo consistiu em Tris 25mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% (m/v) (pH 8,3). Após corrida, os géis foram corados em uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v) em água e etanol 1:1 (v/v) e descorados em uma solução de ácido acético 7%. A corrida das frações cromatográficas coletadas foram realizada em paralelo com a utilização de marcadores de massa molecular fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), lactalbumina (14,4 kDa) (Cytiva Global Life Sciences Solutions, MA, EUA) e PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder (#26630, Thermo Fischer Scientific).

3.6 Avaliação do reconhecimento e especificidade dos anticorpos

A análise do reconhecimento conformacional dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 foi avaliada pelo teste ELISA indireto em microplaca de 96 poços de poliestireno de alta afinidade (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria), como descrito por Borges et al., 2019. Primeiramente, a microplaca foi revestida com 50 μ g/mL de peçonha bruta de *B. jararacussu* e *B. pauloensis* em quadruplicatas e, em seguida foram aplicadas 50 μ g/mL das toxinas BnSP-7, BThTX-I, BThTX-II e Pollonein-LAAO em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6) e incubada overnight a 4°C. No dia seguinte, foi feita a lavagem com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) cinco vezes e, em seguida, a adição de BSA a 5% em PBS (PBS-B) como solução de bloqueio e deixada a 37°C por 1h. Após isso, foi feita a lavagem novamente cinco vezes com PBS-T. Em seguida,

50µg/mL anticorpo anti-BnSP-7 e IgY PBS solubilizados em BSA 1% (50 µg/ml) foram adicionados e a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos. A lavagem com PBS-T foi repetida por cinco vezes e o anticorpo secundário anti-chicken IgY HR diluído 1:20.000 em BSA 1% foi adicionado, para então incubar a placa novamente a 37°C por 30 minutos. Por último, foi feito o descarte da solução contida na placa e a adição de 100 µL por poço de revelador TMB (IDEXX, EUA) deixando reagir 10 minutos em temperatura ambiente e, por fim, foi adicionado 25µL por poço da solução de interrupção (IDEXX, EUA) e foi feita a leitura a 650 nm em uma leitora de placa (Multiskan GO, Thermo Scientific).

Para a análise de sensibilidade do anticorpo frente ao antígeno, 10µg/mL de PLA₂ BnSP-7 foram aplicadas a placa, em seguida foram adicionadas diferentes concentrações do IgY anti-BnSP-7 ou de IgY PBS (10; 30 e 50 µg/mL), respectivamente). As etapas do ELISA foram realizadas como descrito acima.

O Índice ELISA (IE) foi calculado pela razão entre os valores de absorbância obtidos (OD) e o valor de corte (“cutoff”) (**Equação 1**). O cutoff foi estabelecido pela soma da média dos valores de OD do controle negativo (IgY PBS) com 3 vezes o desvio padrão entre as triplicatas do IgY PBS (**Equação 2**). Os valores de IE >1,2 foram considerados positivos.

$$IE = \frac{\bar{X}i}{cutoff} \text{ (Equação 1)}$$

Em que: IE= Índice ELISA e $\bar{X}i$ = média dos valores de OD da amostra.

$$Cutoff = \bar{X} + (3 \cdot DP) \text{ (Equação 2)}$$

Em que: \bar{X} = média dos valores de OD do controle negativo e DP= desvio padrão dos valores de OD do controle negativo.

3.7 Análise do potencial citotóxico do anticorpo IgY anti-BnSP-7 frente a linhagem tumoral de próstata PC-3

3.7.1 Manutenção das células e linhagem celular

As células de adenocarcinoma humano (PC-3) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (CRL-1435) e mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Cultilab, Brasil), 100 U/mL

penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Sigma, Brasil) a 37 °C e 5% CO₂, denominado como meio RPMI 1640 completo.

3.7.2 Ensaio de viabilidade celular

Células da linhagem PC-3 (2×10^4 poço) foram semeadas em microplaca de 96 poços contendo meio RPMI 1640 completo por 24h a 37°C em incubadora com 5% CO₂. Em seguida, as células foram incubadas com meio RPMI 1640 completo na ausência (grupo controle)) ou presença de diferentes concentrações de IgY anti-BnSP-7 (variando de 0,09 a 50µg/mL).

Após o tratamento as células foram incubadas com o reagente de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (5mg/mL, 20µL/poço) por 3 horas a 37°C. Então foram adicionados 100µL de PBS contendo 10% de SDS e 0,01M de HCl em cada poço por 18h para a completa dissolução dos cristais de Formazan formados a partir do consumo do MTT pelas enzimas mitocondriais. Após 18h a densidade óptica foi lida a 570nm em um leitor de placas (Multiskan GO, Thermo Scientific, EUA). A curva concentração-resposta foi obtida pelo software GraphPad prism versão 6.0 (Inc., CA, EUA).

3.7.3 Ensaio de adesão celular

Para avaliar a adesão de células PC-3 (3×10^4 células/poço) foram pré-incubadas com meio RPMI 1640 completo com diferentes concentrações de IgY anti-BnSP-7 (0,78 µg/µL, 1,56 µg/µL e 3,125 µg/µL) por 1h a 37°C, sendo que para o grupo controle foram utilizadas células não tratadas. Em seguida, as células foram dispostas em microplacas de 96 poços previamente revestidas com colágeno IV (10 µg/mL, Sigma, Brasil), fibronectina (5 µg/mL, Gibco, EUA) ou Matrigel™ (1:10, Corning, EUA), mantidas *overnight* em câmara úmida e bloqueadas com BSA por 1h. Após 3h de incubação a 37°C, as células não aderidas foram removidas por lavagem com PBS e as células aderentes foram avaliadas pelo ensaio MTT conforme descrito no item 3.7.2.

3.7.4 Ensaio de wound healing

As células PC-3 ($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo meio RPMI 1640 completo e incubadas por 24h a 37°C em incubadora com 5% CO₂. Após atingir a confluência, uma lesão artificial foi feita na monocamada de células com o auxílio de uma ponteira de 200µL. Para remover as células

desaderidas, foi realizada a lavagem dos poços com PBS. Em seguida, as células foram incubadas com meio RPMI 1640 completo na ausência (grupo controle) ou presença de diferentes concentrações de IgY anti-BnSP-7 (0,78 µg/µL, 1,56 µg/µL e 3,125 µg/µL) por 24h. Em busca de avaliar o processo de migração, o microscópio invertido (Nikon Eclipse T5100) foi utilizado para fotografar a monocamada imediatamente após a lesão (t= 0h) e após 24h de tratamento (t= 24h). Assim, a migração horizontal realizada pelas células na lesão artificial, foi quantificada com o auxílio do software *Image J* e a porcentagem de cicatrização pode ser obtida pela equação:

$$\% \text{ cicatrização} = \frac{(At0h - At24h)}{At0h} \times 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

Em que: At0h= área da lesão após realizá-la e At24h= área da lesão após 24h.

3.7.5 Ensaio de migração celular por *transwell*

O ensaio de migração celular por *transwell* foi realizado usando um ThinCert™, poro de 8,0µm (Greiner Bioone®, Brasil). As células PC-3 (5x10⁴ células/poço) foram pré-incubadas com meio RPMI 1640 livre de SFB na ausência (grupo controle) ou presença de diferentes concentrações de IgY anti-BnSP-7 (0,78 µg/µL, 1,56 µg/µL e 3,125 µg/µL), por 1h a 37°C em incubadora com 5% CO₂. Em seguida, as células foram inseridas na câmara superior do *transwell*, que foi imersa em poços contendo meio RPMI 1640 completo, e a migração celular foi permitida a ocorrer por 24h a 37°C. O *transwell* inserido no meio RPMI 1640 sem SFB foi considerado como controle negativo, enquanto o controle positivo foi o *transwell* inserido em meio RPMI 1640 completo, sendo ambos incubados como descrito anteriormente. As células que não migraram foram removidas da câmara superior com o auxílio de um *swab*, enquanto as que migraram foram coradas com Kit Panotic (Laborclin, Brasil). A migração celular foi quantificada por células contadas sob um microscópio (Nikon, Eclipse TS100) com aumento de 20x.

3.8. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata em pelo menos três experimentos independentes e os resultados foram expressos em média ± S.E.M. Todos os dados foram primeiramente checados para distribuição normal. Em seguida as diferenças estatísticas entre os grupos tratados e controles foram determinadas por one-

way ANOVA, two-way ANOVA ou Student's t-test, de acordo com o projeto experimental (GraphPad Prism Software version 6.01). Diferenças entre grupos foram considerados estatisticamente significativos com valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Purificação de IgY

O isolamento de IgY é um processo eficiente, econômico com alto rendimento proteico da gema dos ovos de galinhas previamente imunizadas. A purificação desse anticorpo consiste na remoção dos lipídeos, para que seja formada uma fração solúvel em água, seguida pela precipitação dos anticorpos nela contidos. Desse modo, podem ser purificados a partir de diferentes estratégias, como diluição em água ultrapura, precipitação com polietilenoglicol (PEG), solventes orgânicos, como sulfato de amônio, ultrafiltração e por cromatografia (LEÓN-NÚÑEZ *et al.*, 2022; PAULY *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2019).

No presente estudo, os IgY anti-BnSP-7 e os anticorpos obtidos de galinhas que receberam apenas PBS, foram isolados e purificados por meio da combinação de precipitação salina em sulfato de amônio seguida de filtração (dados não mostrados) e cromatografia de afinidade HiTrap IgY HP. Os perfis cromatográficos de afinidade (**Figura 5 e 6**), evidenciaram três picos, sendo que o segundo pico corresponde à fração proteica contendo IgY.

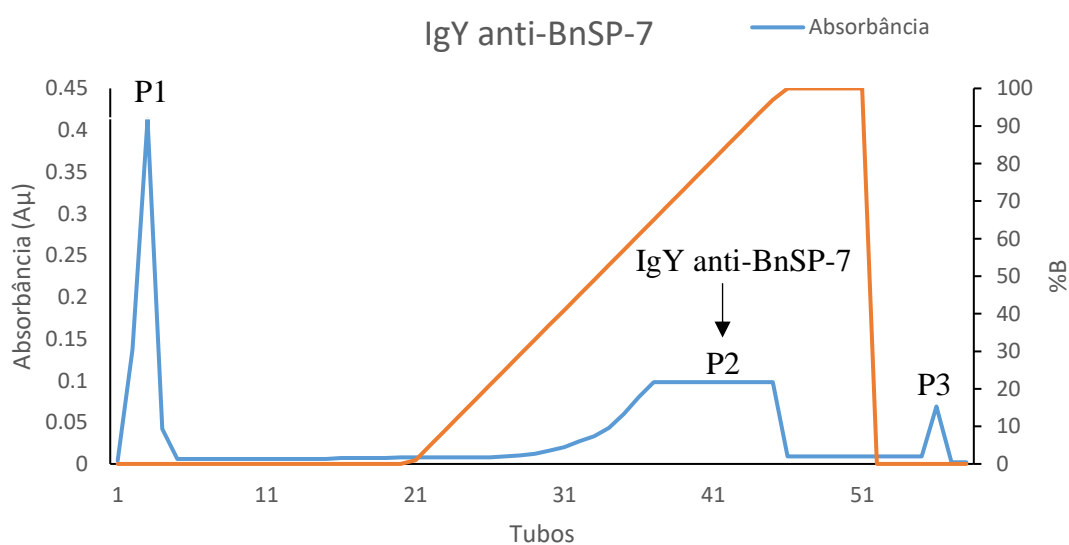


Figura 5: Perfil cromatográfico da purificação dos anticorpos IgY anti-BnSP-7. Purificação dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 a partir de 10 mg do extrato proteico de gemas de ovos de galinhas em coluna de afinidade HiTrap IgY HP (Cytiva; 16 x 25 mm; 5 mL). As frações foram coletadas com fluxo de 1mL/min, 2mL por tubo. P1 corresponde a fração coletada durante a passagem do tampão de ligação (NaH_2PO_4 0,02M; K_2SO_4 0,5M; pH 7,4); P2 corresponde a fração coletada durante a passagem do tampão de eluição (B) (fosfato de sódio 0,02M, pH 7,5), contendo as frações de IgY, e P3 corresponde a fração coletada durante a passagem do tampão de limpeza (fosfato de sódio 0,02M com 30% de isopropanol v/v, pH 7,5). Perfil cromatográfico representativo de 4 ensaios independentes.

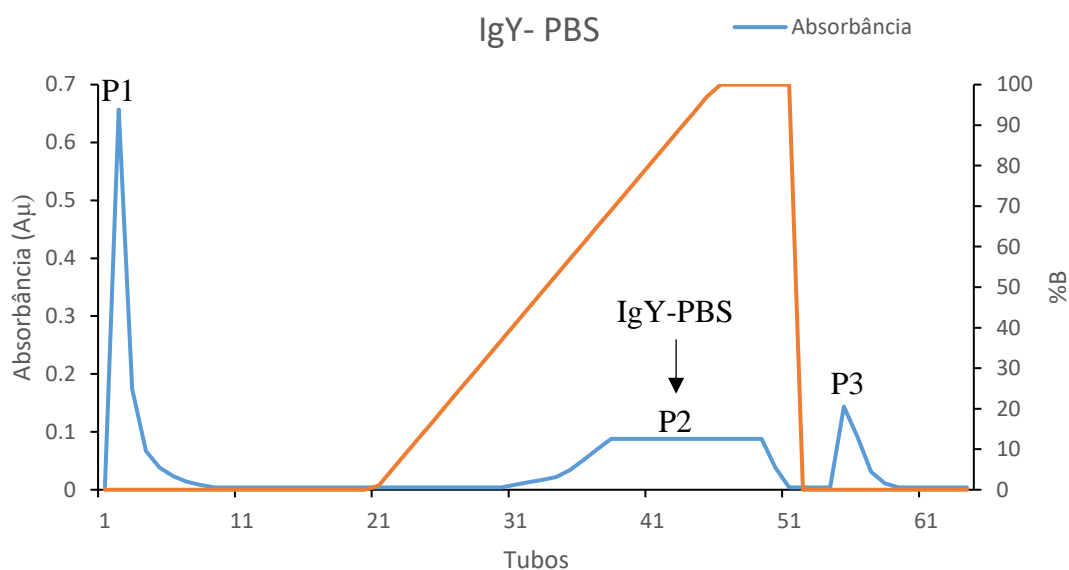


Figura 6: Perfil cromatográfico da purificação dos anticorpos IgY- PBS. Purificação dos anticorpos IgY- PBS a partir de 10 mg do extrato proteico de gemas de ovos de galinhas em coluna de afinidade HiTrap IgY HP (Cytiva; 16 x 25 mm; 5 mL). As frações foram coletadas com fluxo de 1mL/min, 2mL por tubo. P1 corresponde a fração coletada durante a passagem do tampão de ligação (NaH_2PO_4 0,02M; K_2SO_4 0,5M; pH 7,4); P2 corresponde a fração coletada durante a passagem do tampão de eluição (B) (fosfato de sódio 0,02M, pH 7,5), contendo as frações de IgY, e P3 corresponde a fração coletada durante a passagem do tampão de limpeza (fosfato de sódio 0,02M com 30% de isopropanol v/v, pH 7,5). Perfil cromatográfico representativo de 3 ensaios independentes.

A homogeneidade das amostras obtidas após o fracionamento do extrato proteico de gemas de ovos em coluna de afinidade foi evidenciada por eletroforese em SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras (**Figura 7**). Após a análise em SDS-PAGE, foi verificado que as frações proteicas referentes as imunoglobulinas IgY, possuem bandas eletroforéticas correspondentes à cadeia pesada (67-70 kDa) e à cadeia leve (25kDa), comprovando que a purificação foi realizada com êxito. A homogeneidade das amostras indica que a combinação entre os métodos de purificação das imunoglobulinas

das gemas utilizando inicialmente a diluição em água, seguida por precipitação por sulfato de amônio e finalmente a cromatografia de afinidade em HiTrap IgY HP permitiu a obtenção dos anticorpos IgY com bom grau de pureza.

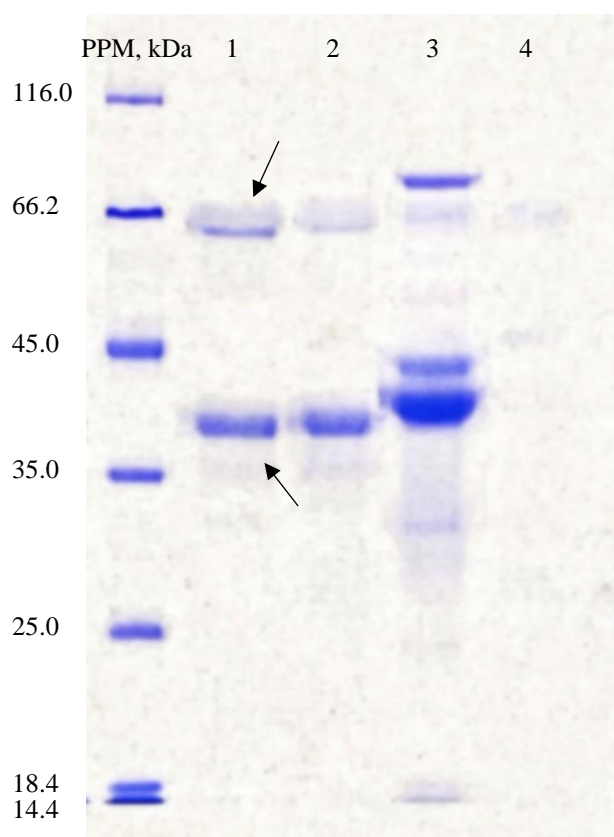


Figura 7 Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12,5%), indicando em (1) IgY anti-BnSP-7, (2) IgY PBS, (3) o concentrado proteico da gema do ovo sem afinidade à coluna e (4) outros componentes do extrato proteico, sem identificação de peso molecular. As setas indicam a cadeia pesada e a cadeia leve do anticorpo, respectivamente.

O rendimento proteico das frações obtidas após as cromatografias de afinidade em coluna HiTrap IgY HP do extrato livre de lipídeos das gemas de ovos de galinhas imunizadas com BnSP-7 e PBS estão apresentados na **Tabela 1**. Como pode ser observado, ambos os anticorpos IgY corresponderam a cerca de 6% do extrato total de proteínas. Borges et al. (2019) utilizando esse mesmo protocolo de obtenção de anticorpos IgY anti-BnSP-7 obtiveram um alto rendimento de anticorpos IgY. Neste prévio estudo, a concentração proteica média de anticorpos IgY totais, das galinhas imunizadas com a BnSP-7, foi de 4 mg/mL de gema pura. No entanto, em nosos estudos não foi possível estimar o rendimento total em mg de proteína por mL de gema, visto que o mesmo foi

calculado a partir da massa de proteínas totais aplicadas às colunas sem correspondência com o volume por gema.

Tabela 1: Rendimento proteico do extrato da gema de ovos de galinhas imunizadas com BnSP-7 e PBS livres de lipídeos.

Amostra	Massa (mg)	Rendimento (%)
Extrato proteico imunização com PBS	30	100
Fração contendo IgY PBS	1,94*	6,46
Extrato proteico imunização com BnSP-7	40	100
Fração contendo IgY anti- BnSP-7	2,73*	6,82

* Dosagem realizada pelo método Bradford (1976).

4.2. O anticorpo IgY anti-BnSP-7 apresenta reatividade cruzada sobre PLA₂ em diferentes peçonhas botrópicas

Anticorpos purificados (IgY anti-BnSP-7) foram testados quanto a sua capacidade de reconhecer diferentes PLA₂s presentes nas peçonhas de *Bothrops pauloensis* e *Bothrops jararacussu*, bem como sobre PLA₂s isoladas. O resultado obtido infere que o anticorpo possui reatividade cruzada para as peçonhas brutas de *B. jararacussu*, *B. pauloensis* e para as toxinas BnSP-7, BthTX-I e BthTX-II, sendo maior para BthTX-I (**Figura 8**). Os valores de IE foram, respectivamente, 1,45; 1,51; 1,51; 1,76 e 1,48, sendo todos acima do valor de *cutoff* (IE >1,2). Observa-se, ainda, que o IE de LAAO está abaixo de 1,2, visto que, provavelmente, não possui similaridade estrutural com fosfolipases e, portanto, não foi reconhecida pelo anticorpo.

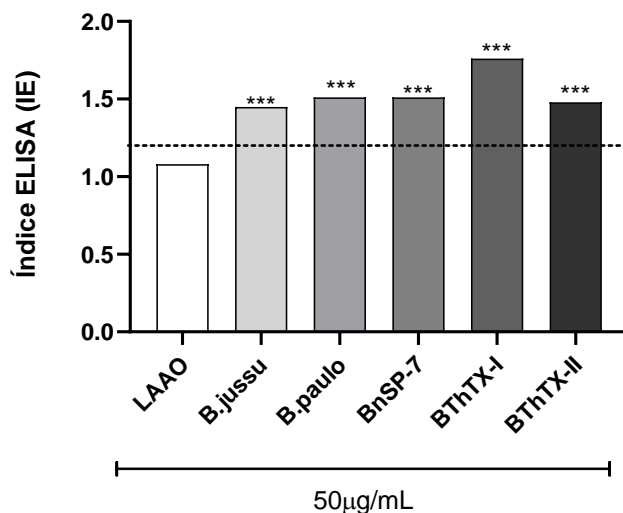


Figura 8: Reatividade cruzada de anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7 pelo ensaio de ELISA indireto contra peçonhas brutas (*B. jararacussu*- *B. jussu* e *B. pauloensis* – *B. paulo*) e diferentes toxinas (PLA₂ BnSP-7, PLA₂ BthTx-I e PLA₂ BthTx-II) e Pollonein-LAAO de *B. moojeni*. Os antígenos e o anticorpo foram fixados em 50 µg/mL. A linha tracejada representa o valor mínimo de IE para resultados positivos. (*) Diferença significativa em relação à Pollonein-LAAO (One-way ANOVA, $p < 0,05$).

O perfil de reatividade cruzada demonstra que podem conter PLA₂s Lys49 presentes nas peçonhas brutas de *B. pauloensis* e *B. jararacussu*, as quais compartilham semelhanças estruturais com a BnSP-7 (FILKIN *et al.*, 2020; MAGRO *et al.*, 2003). Alves e colaboradores (2019) ao realizar o alinhamento múltiplo das toxinas isoladas BnSP-7, BnSP-6, BThTX-I, BThTX-II e MjTX-II, demonstraram que há regiões conservadas similares entre as estruturas primárias dessas proteínas, com alta identidade e similaridade entre BthTX-I, uma PLA₂ Lys49 e BnSP-7 e menor grau entre BthTX-II, uma PLA₂ Asp49, e a BnSP-7, respaldando o resultado apresentado na Figura 7.

Entretanto, observa-se que os valores de IE apresentado para *B. pauloensis* e BnSP-7 foram menores do que o de BthTX-I. Esse resultado sugere que, provavelmente, os epítomos de BthTX-I foram melhor apresentados ao anticorpo do que os de BnSP-7. Borges e colaboradores (2019), em seus estudos, analisaram a capacidade dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 de reconhecerem epítomos contínuos ou descontínuos nas estruturas da proteína alvo (BnSP-7). Os anticorpos não foram capazes de reconhecer a BnSP-7 desnaturada, ou seja, em sua estrutura primária. Assim, outra hipótese seria uma possível desnaturação parcial de BnSP-7, de maneira que houve menor reconhecimento pelo IgY anti-BnSP-7 e, conseqüentemente, menor IE, tendo em vista a perda parcial de epítomos conformacionais.

Outros estudos demonstraram a produção de anticorpos IgY anti-BnSP-7 e seu potencial de reconhecimento sobre diferentes proteínas nas peçonhas ofídicas. Melo e colaboradores (2017) descreveram a utilização de anticorpos policlonais de camundongos Balb-c anti-BnSP-7 para analisar a reatividade cruzada sobre diferentes peçonhas de serpentes. Por meio do ensaio de ELISA e Western Blotting, os anticorpos foram capazes de reconhecer as isoformas de PLA₂ na peçonha de *B. pauloensis* e *B. moojeni*, no entanto, apresentaram baixo reconhecimento para *B. diporus*, *B. jararaca* e *B. alternatus*. Dessa forma, o dados obtidos no presente estudo estão de acordo com a literatura, indicando que os anticorpos IgY anti-BnSP-7 são eficazes no reconhecimento de PLA₂ Lys 49.

4.3. O anticorpo IgY anti-BnSP-7 é capaz de reconhecer a toxina BnSP-7 em diferentes concentrações

O reconhecimento de IgY anti-BnSP-7 em diferentes concentrações do antígeno BnSP-7 foi analisada. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório descreveram a sensibilidade deste anticorpo nas concentrações de 10µg/mL, 20µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL em reconhecer diferentes concentrações de BnSP-7 (10µg/ml, 20µg/mL e 50µg/mL), sugerindo que independente das concentrações de BnSP-7, o anticorpo foi capaz de reconhecer o alvo, inclusive em suas menores concentrações (10µg/mL) (PIMENTEL, 2022). Com esse embasamento, testamos a capacidade de reconhecimento de diferentes concentrações de IgY anti-BnSP-7 (10µg/mL, 30µg/mL e 50µg/mL) frente a 10µg/mL de BnSP-7.

O resultado obtido revela que a capacidade de reconhecimento desse anticorpo está relacionada a sua concentração, visto que, em maiores concentrações, maior foi o reconhecimento (IE= 1,325; 1,390 e 1,509 para as concentrações de 10µg/mL 30µg/mL e 50µg/mL, respectivamente).

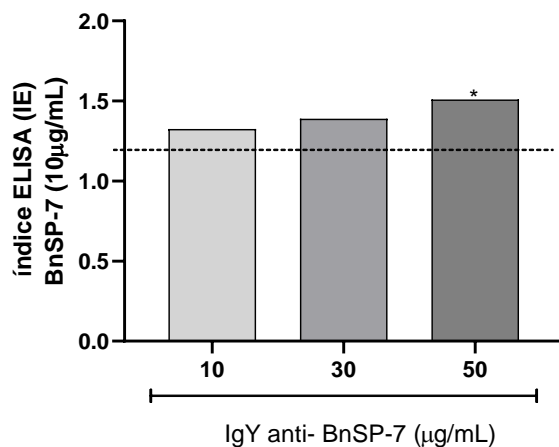
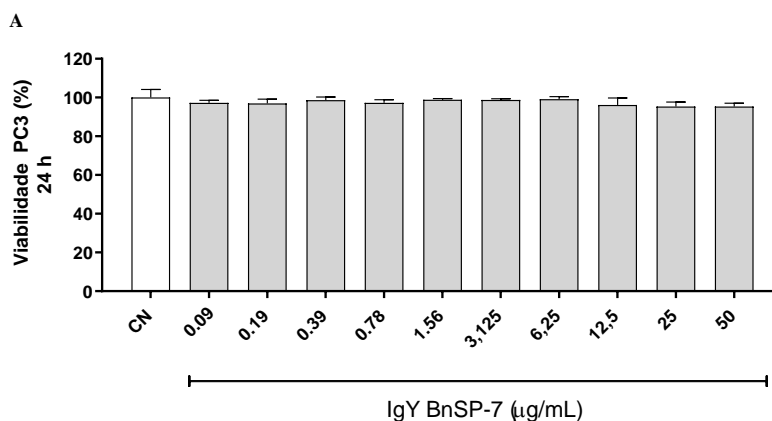


Figura 9: Análise da sensibilidade do anticorpo IgY anti-BnSP-7 em diferentes concentrações (10, 30, 50µg/mL) por ELISA. A concentração do antígeno foi fixada em 10 µg/mL. A linha tracejada representa o valor mínimo de IE para resultados positivos. (*) Diferença significativa entre as concentrações 10 e 50 µg/mL de IgY anti-BnSP-7 (One-Way ANOVA, $p < 0,05$).

4.4 O anticorpo IgY anti-BnSP-7 afeta parcialmente a progressão tumoral

Buscando avaliar o potencial citotóxico dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 sobre as células tumorais de próstata (PC-3), foi realizado o ensaio de MTT. O anticorpo não foi capaz de diminuir significativamente a viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas (0,09- 50µg/mL) após 24 h (**Figura 10A**). Entretanto, após 48h de tratamento, foi possível observar que a partir de 0,78µg/mL, houve uma diferença estatística significativa entre as porcentagens de viabilidade quando comparado ao controle ($p < 0,05$), de modo que esse efeito é dependente da concentração (**Figura 10B**). A partir desses resultados, selecionamos as concentrações mais baixas que obtiveram diferença estatística (0,78µg/mL, 1,56µg/mL e 3,125µg/mL) para dar continuidade aos ensaios.



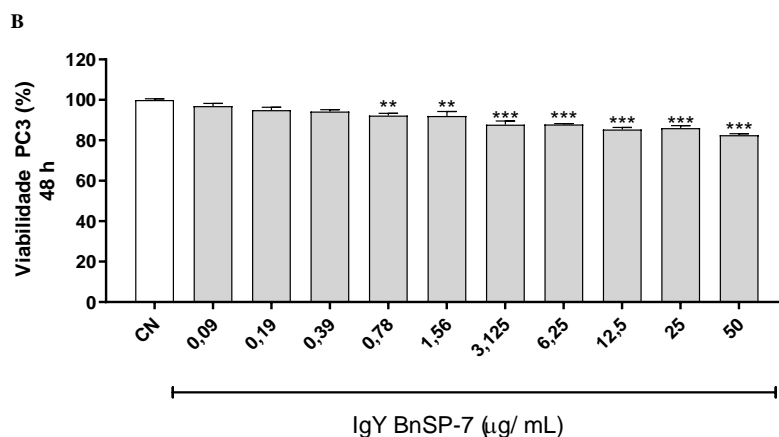


Figura 10: Efeito citotóxico dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 sobre células tumorais de próstata PC-3 após (A) 24h e (B) 48h. Os tratamentos variaram de 50 a 0,09 µg/mL. Meio RPMI 1640 completo com PC-3 não tratadas foram utilizadas como controle negativo para morte celular. (**) e (***) representam a diferença significativa das concentrações de IgY quanto ao controle negativo (CN) (One-Way ANOVA, $p < 0,05$).

O resultado obtido evidencia que o anticorpo é capaz de causar apenas uma baixa citotoxicidade em células PC-3 *in vitro*, o que pode estar relacionado a ausência de um microambiente celular complexo. A ação citotóxica *in vivo* de um anticorpo é indireta, assim, pode atuar por meio da ativação do sistema complemento pela via clássica; opsonização dos antígenos para aumentar a fagocitose e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), em que os anticorpos marcam os agentes para serem destruídos pelas células do sistema imune inato (células NK) (ABBAS *et. al.*, 2015; TEVA; FERNANDEZ; SILVA, [S.d.]). Portanto, a inexistência dessas outras células poderiam justificar a baixa taxa de morte celular.

Estudo realizado por Vainio e colaboradores (2011), demonstrou que o silenciamento gênico do grupo VII PLA₂ (PLA2G7) em cultura de células PC-3 não afetou a viabilidade celular, no entanto, diminuiu a capacidade das células de migrarem em culturas 2D e 3D, confirmando o papel da PLA2G7 em promover migração e invasão em CaP. Com isso, decidimos investigar se anticorpo anti-BnSP-7 poderia interferir nos processos de adesão e migração celular, eventos imprescindíveis para o processo metastático.

A adesão célula-célula é reduzida durante o processo de metástase, sendo um dos fatores chave para a disseminação das células neoplásicas do tumor primário para outros órgãos (GKRETSI; STYLIANOPOULOS, 2018). Sadaria e colaboradores (2011) demonstraram que a inibição de sPLA₂ com ácido 5-(4-benziloxifenil)-4S-(7-fenilheptanoilamino) pentanóico em células FLO-1 de adenocarcinoma de esôfago, diminuiu

a expressão da molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e atenuou a ativação de NF- κ B. Além disso, Gimenes e colaboradores (2017) demonstraram em seu estudo que a inibição de PLA₂ com γ CdcPLI, derivado de *Crotalus durissus collilineatus*, em células MDA-MB-231 de câncer de mama, resultou na diminuição da adesão, migração e invasão. O γ CdcPLI também foi capaz de reduzir a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e dos níveis de prostaglandinas, além de inibir a expressão de genes e proteínas da via PI3K/ Akt.

No entanto, em células PC-3, o anticorpo IgY-BnSP-7 não foi capaz de inibir significativamente o processo de adesão em nenhum dos componentes da matriz extracelular testados (matrigel, colágeno IV e fibronectina), em nenhuma das concentrações testadas (0,78 a 3,125 μ g/mL) (**Figura 11 e 12**). Ao serem comparados à literatura, esses resultados sugerem que diversos tipos de câncer respondem de forma diferente à inibição de PLA₂.

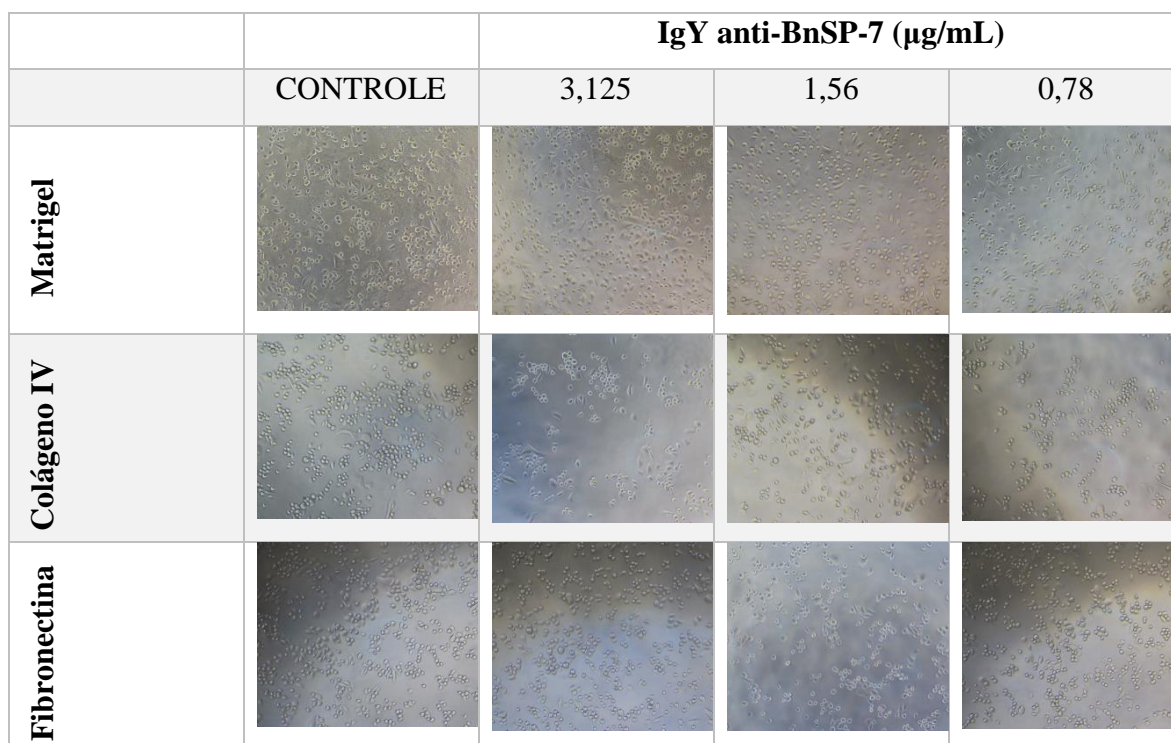


Figura 11: Fotomicrografia representando a adesão das células PC-3 em poços previamente revestidas com Matrigel, colágeno IV e fibronectina, após tratamento com IgY anti-BnSP-7 variando de 0,78 a 3,125 μ g/mL. Meio RPMI 1640 completo com células PC-3 não tratadas foram utilizados como controle positivo para adesão celular. Ampliada 10x.

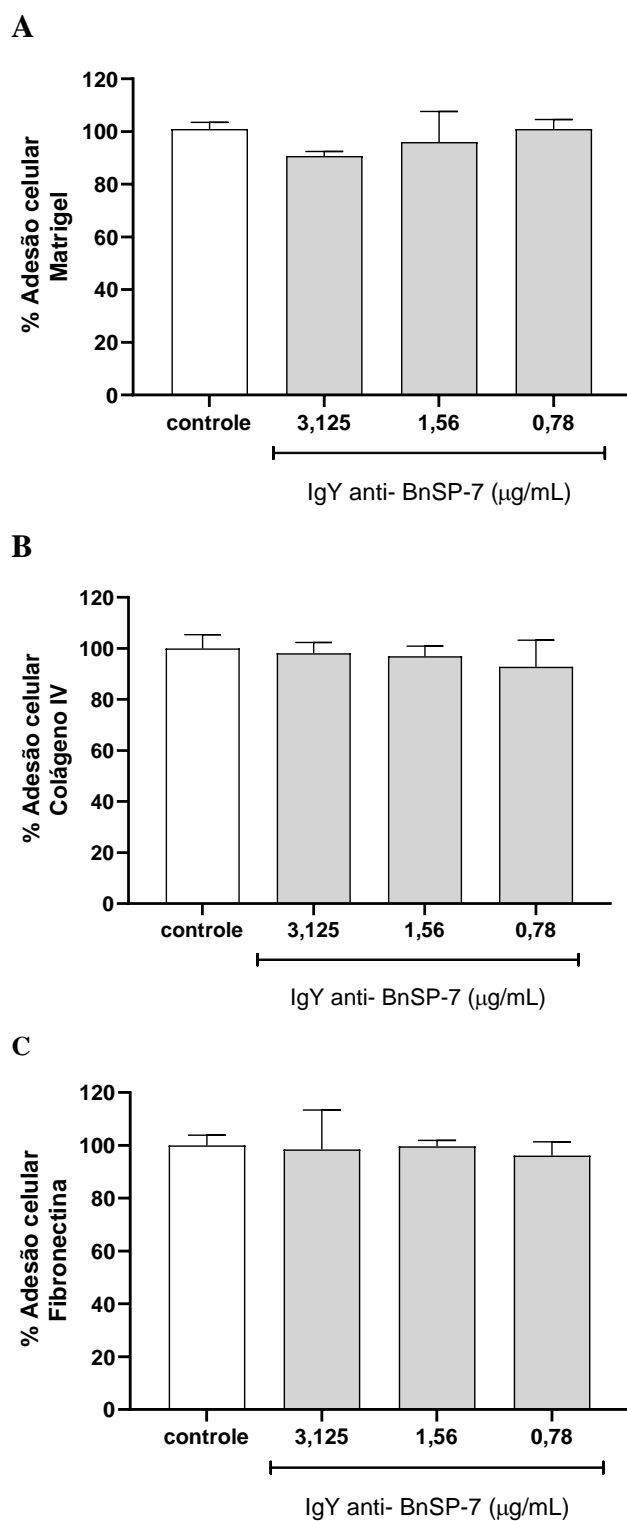
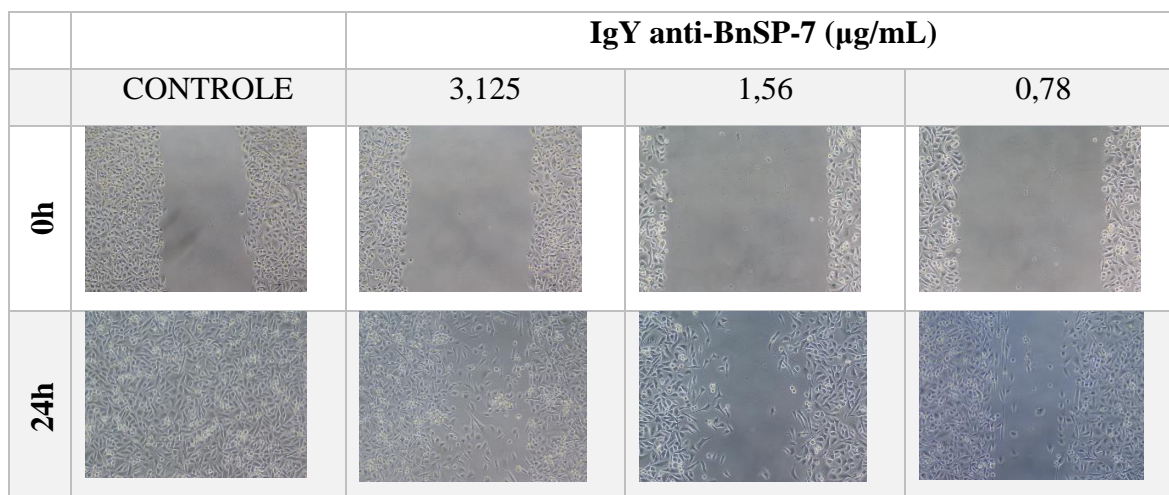


Figura 12: Porcentagem de adesão celular de PC-3 após tratamento com IgY anti-BnSP-7 (0,78 a 3,125 µg/mL) por 3h em (A) matrigel, (B) colágeno, (C) fibronectina, avaliado pelo ensaio de MTT.

Arelado ao processo de adesão, as células passam por alterações bioquímicas reversíveis que permitem que as células epiteliais adquiram o fenótipo de células

mesenquimais, conferindo a capacidade de migração, crucial para o progresso do câncer e metástase, processo esse denominado transição epitelial-mesenquimal (EMT) (FARES et al., 2020). O anticorpo IgY anti-BnSP-7 afetou a migração de células PC-3 em dois modelos de migração, ensaio por *wound healing* e ensaio com *transwell*. No ensaio de *wound healing* (**Figuras 13A e 13B**) o anticorpo inibiu a porcentagem de fechamento em 19,3%, 22,9% e 7,9% em concentrações variando de 0,78 a 3,125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, comparado ao controle. IgY anti-BnSP-7 também inibiu a migração de células PC-3 no ensaio com *transwell* quando se utilizou a concentração de 3,125 $\mu\text{g/mL}$ comparado ao controle positivo (**Figuras 14A e 14B**). No controle positivo, o número de células que haviam migrado foi de 467 células, sendo reduzido para cerca de 265 células.

A



B

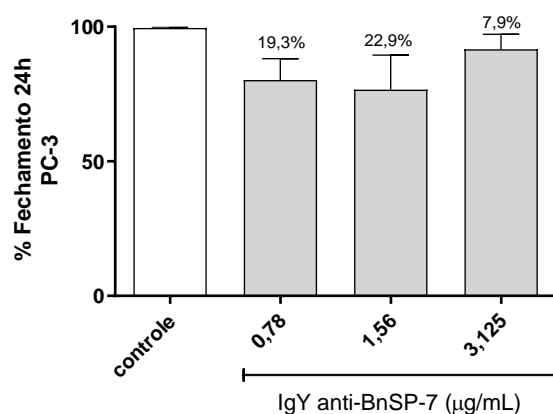
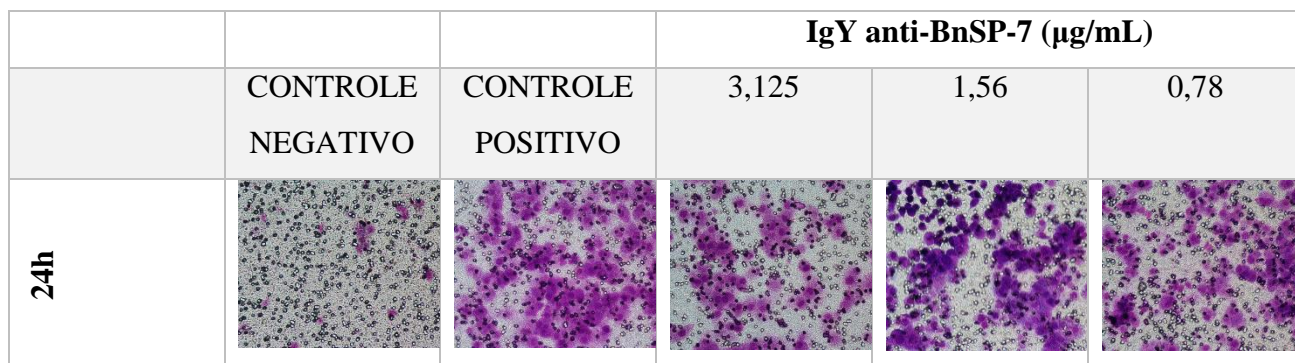


Figura 13: (A) Fotomicrografia representando a lesão feita com ponteira de 200 μL (0h) e o fechamento da mesma (24h) após tratamento com IgY anti-BnSP-7 variando de 0,78 a 3,125 $\mu\text{g/mL}$. Meio RPMI 1640 completo com células PC-3 não tratadas foram utilizados como controle negativo para inibição da migração horizontal. Ampliada 10x. (B) Porcentagem de fechamento da lesão após 24h (software ImageJ).

Porcentagens destacadas acima das barras representam a porcentagem de inibição do tratamento realizado com IgY anti-BnSP-7.

A



B

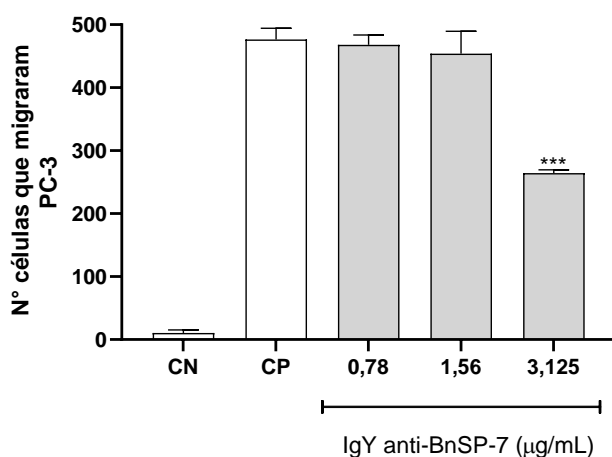


Figura 14: (A) Fotomicrografia representando a migração celular de PC-3 após tratamento com IgY anti-BnSP-7 (0,78 a 3,125 $\mu\text{g/mL}$) por 24h. Células não tratadas incubadas sem e com soro fetal bovino (SFB), foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. As células foram coradas com Kit Panotic. Aumento 20x. (B) Efeito de inibição de diferentes concentrações de IgY anti-BnSP-7 na migração de células PC-3 pelo ensaio de migração em *transwell*. Células não tratadas incubadas sem e com soro fetal bovino (SFB), foram utilizadas como controle negativo (CN) e positivo (CP), respectivamente. (***) representa a diferença significativa das concentrações de IgY quanto ao controle positivo (One-Way ANOVA, $p < 0,05$).

Alguns estudos também demonstraram o impacto da inibição de fosfolipases na migração tumoral. Tunset e colaboradores (2019) demonstraram que a inibição de cPLA₂ α por CIX (inibidor X de cPLA₂ α), a concentrações não tóxicas, bloqueia migração de células murinas de câncer de mama metastáticas 4T1, além de reduzir a produção de prostaglandinas. Chen e colaboradores (2017) reportaram a expressão aberrante de cPLA₂ α em células de câncer de mama MDA-MB-231. O *knockdown* de cPLA₂ α nessas células inibiu a indução de EMT por TGF- β pela via

PI3/Akt. Dong e colaboradores (2014) demonstraram que a inibição de sPLA₂-IIa por anticorpo, inibe a ativação de NF-κB e bloqueia a ligação entre sPLA₂-IIa e receptores de EGFR (HER1), tendo efeitos anti-câncer em células cancerígenas de pulmão A549 (CHEN *et al.* 2017).

Em nossos estudos, verificamos que os anticorpos IgY anti-BnSP-7 nas concentrações testadas apesar de não terem sido efetivos em interferir na viabilidade e na adesão de células tumorais PC-3, causaram uma discreta alteração na migração celular, o que abre caminho para novos estudos que visam explorar melhor seu papel nesses mecanismos, ou até mesmo avaliar o seu potencial de reconhecimento frente à PLA₂s endógenas envolvidas nos processos de proliferação e progressão tumoral.

5. CONCLUSÃO

No presente estudo, foram produzidos e purificados anticorpos IgY anti-BnSP-7, uma fosfolipase A₂ Lys49 homóloga de *B. pauloensis*. Esse anticorpo foi capaz de reconhecer diferentes PLAs em peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. pauloensis*, além de reconhecer toxinas BthTX-I, BthTX-II e seu próprio antígeno (BnSP-7) em diferentes concentrações de anticorpo. Ademais, avaliamos o potencial citotóxico e anti-metastático de IgY anti-BnSP-7, frente ao câncer de próstata. O anticorpo causou baixa toxicidade em células PC-3 e não foi capaz de inibir o processo de adesão celular. Todavia, foi capaz de inibir a migração celular, um dos processos cruciais para a metástase tumoral. Novos estudos são necessários para compreender e elucidar mecanismos moleculares pelos quais o anticorpos IgY anti-BnSP7 poderia interferir durante a migração celular. Por fim, esses resultados demonstram que as fosfolipases A₂ participam de processos imprescindíveis para o desenvolvimento tumoral e sua inibição por anticorpos pode ser uma ferramenta biotecnológica interessante para auxiliar no tratamento de câncer.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, ABUL K; LICHTMAN, ANDREW H; PILLAI, Shiv. *Imunologia Celular e Molecular. Imunologia celular e molecular*, v. 8^o edição, p. 1 a 1262, 2015.
- ALBERGHINA, Mario. Phospholipase A2: New lessons from endothelial cells. *Microvascular Research*, v. 80, n. 2, p. 280–285, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2010.03.013>>.
- ALOULOU, Ahmed *et al.* *Phospholipases: An Overview*. [S.l: s.n.], 2018. v. 1835.
- ALVES, S.N. Reatividade cruzada de anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7 com fosfolipases (PLA2s) de diferentes peçonhas ofídicas e predição in silico de epítomos de células B, Estado de Minas Gerais. [Monografia]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2019.
- BORGES, Isabela Pacheco. ANTICORPOS IGY POLICLONAIIS ANTI-FOSFOLIPASE A2: FERRAMENTA AUXILIAR PARA O ESTUDO DA AÇÃO ANTI-PARASITÁRIA. 2019.
- BORGES, Isabela Pacheco *et al.* Antiparasitic effects induced by polyclonal IgY antibodies anti-phospholipase A2 from Bothrops pauloensis venom. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 112, p. 333–342, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.178>>.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976. <http://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- BRASIL, Ministério da Saúde. *Mais de 3 mil novos casos de câncer de próstata são esperados no Ceará em 2022*. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/suporte-aos-estados/ceara/mais-de-3-mil-novos-casos-de-cancer-de-prostata-sao-esperados-no-ceara-em-2022>>. Acesso em: 10 de jan. de 2023.
- B. VENDRAMINI-COSTA, D.; E. CARVALHO, J. Molecular Link Mechanisms between Inflammation and Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, v. 18, n. 26, p. 3831–3852, 2012.
- BENNETT, Daine T. *et al.* Cancer stem cell phenotype is supported by secretory phospholipase A 2 in human lung cancer cells. *Annals of Thoracic Surgery*, v. 98, n. 2, p. 439–446, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2014.04.044>>.
- CHEN, Lu *et al.* CPLA2 α mediates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer through PI3k/Akt signaling. *Cell Death and Disease*, v. 8, n. 4, p. 1–13, 2017.
- CUMMINGS, Brian S. Phospholipase A2 as targets for anti-cancer drugs. *Biochemical Pharmacology*, v. 74, n. 7, p. 949–959, 2007.
- DENNIS, Edward A *et al.* Phospholipase A enzymes Physical Structure, Biological

- Function,.pdf. *Chemical Reviews*, v. 111, p. 6130–6185, 2011.
- DONG, Qihan *et al.* Oncogenic action of phospholipase A2 in prostate cancer. *Cancer Letters*, v. 240, n. 1, p. 9–16, 2006.
- DONG, Zhongyun *et al.* Secretory phospholipase A2-IIa is involved in prostate cancer progression and may potentially serve as a biomarker for prostate cancer. *Carcinogenesis*, v. 31, n. 11, p. 1948–1955, 2010.
- DONG, Zhongyun *et al.* Secretory phospholipase A2-IIa upregulates HER/HER2-elicited signaling in lung cancer cells. *International Journal of Oncology*, v. 45, n. 3, p. 978–984, 2014.
- EPSTEIN, Jonathan I. Prostate cancer grading: a decade after the 2005 modified system. *Modern Pathology*, v. 31, p. 47–63, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2017.133>>.
- FILKIN, S. Yu; LIPKIN, A. V.; FEDOROV, A. N. Phospholipase Superfamily: Structure, Functions, and Biotechnological Applications. *Biochemistry (Moscow)*, v. 85, p. 177–195, 2020.
- GIMENES, Sarah N.C. *et al.* Antitumoral effects of γ cdcPLI, a PLA2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 15–18, 2017.
- HAAS, D E. The role of aspartic acid-49 in the active site of phospholipase A2. *European journal of biochemistry / FEBS*, v. 357, p. 353–357, 1988.
- HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.
- JIANG, Jiazhong *et al.* Expression of group IIA secretory phospholipase A2 is elevated in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma. *American Journal of Pathology*, v. 160, n. 2, p. 667–671, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64886-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64886-9)>.
- KARLSSON, M.; KOLLBERG, H.; LARSSON, A. Chicken IgY: Utilizing the evolutionary advantage. *World's Poultry Science Journal*, v. 60, n. 3, p. 341–347, 2004.
- KIYOHARA, Hideo *et al.* Immunohistochemical localization of group II phospholipase A2 in human pancreatic carcinomas. *International Journal of Pancreatology*, v. 13, n. 1, p. 49–57, 1993.
- LEE, Gun Hee *et al.* PGAP6, a GPI-specific phospholipase A2, has narrow substrate specificity against GPI-anchored proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 295, n. 42, p. 14501–14509, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA120.014643>>.
- LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 6ª Edição, 2014. Ed. Artmed.

- LEÓN-NÚÑEZ, Diana *et al.* IgY Antibodies as Biotherapeutics in Biomedicine. *Antibodies*, v. 11, n. 4, p. 62, 2022.
- MA, Hui; O’KENNEDY, Richard. The structure of natural and recombinant antibodies. *Methods in Molecular Biology*, v. 1348, p. 7–11, 2015.
- Madej T, Lanczycki CJ, Zhang D, Thiessen PA, Geer RC, Marchler-Bauer A, Bryant SH. " MMDB and VAST+: tracking structural similarities between macromolecular complexes. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan; 42(Database issue):D297-303.
- MAGRO, Angelo J. *et al.* Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A 2: Quaternary structure and inhibition mechanism insights. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 311, n. 3, p. 713–720, 2003.
- MELO, Lamartine L. *et al.* Cross-reactivity and inhibition myotoxic effects induced by Bothrops snake venoms using specific polyclonal anti-BnSP7 antibodies. *Biologicals*, v. 50, p. 109–116, 2017.
- MICHAEL, A. *et al.* Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. *Indian Journal of Science and Technology*, v. 3, n. 4, p. 468–474, 2010.
- MIRTTI, Tuomas *et al.* Group IIA phospholipase A2 as a prognostic marker in prostate cancer: Relevance to clinicopathological variables and disease-specific mortality. *Apmis*, v. 117, n. 3, p. 151–161, 2009.
- MOREIRA, Vanessa *et al.* Inflammatory Effects of Bothrops Phospholipases A2: Mechanisms Involved in Biosynthesis of Lipid Mediators and Lipid Accumulation. *Toxins*, v. 13, n. 12, 2021.
- MURAKAMI, Makoto; SATO, Hiroyasu; TAKETOMI, Yoshitaka. Updating Phospholipase A2 Biology. *biomolecules*, v. 10, n. 1457, 2020.
- PAULY, Diana *et al.* Igy technology: Extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. *Journal of Visualized Experiments*, v. i, n. 51, p. 2–7, 2011.
- PENG, Zhangxiao *et al.* Phospholipase A2 superfamily in cancer. *Cancer Letters*, v. 497, n. October 2020, p. 165–177, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.10.021>>.
- PEREIRA, E. P.V. *et al.* Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *International Immunopharmacology*, v. 73, n. May, p. 293–303, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.015>>.
- PIMENTEL, Isabela de Oliveira Cavalcante. *Avaliação do perfil de reconhecimento de anticorpos IgY anti-PLA2 sobre peçonhas botrópicas e extrato proteico de Trypanosoma cruzi.*

2022. 2022.

REBELLO, Richard J. *et al.* Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 7, n. 1, 2021.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>>.

RITCH, Chad; COOKSON, Michael. *Recent trends in the management of advanced prostate cancer. F1000 Falcuty Rev.* [S.l: s.n.], 2018

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 - A Molecular and Integrative Physiology*, v. 121, n. 3, p. 215–222, 1998.

SADARIA, Miral R. *et al.* Secretory phospholipase A2 inhibition attenuates intercellular adhesion molecule-1 expression in human esophageal adenocarcinoma cells. *Annals of Thoracic Surgery*, v. 91, n. 5, p. 1539–1545, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2011.01.017>>.

SANDHU, Shahneen *et al.* Prostate cancer. *The Lancet*, v. 398, n. 10305, p. 1075–1090, 2021. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00950-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00950-8)>.

SATHIANATHEN, Nianjan J. *et al.* Landmarks in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41585-018-0060-7>>.

SEKHOACHA, Mamello *et al.* Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. p. 1–33, 2022.

TEO, Min Yuen; RATHKOPF, Dana E.; KANTOFF, Philip. *Treatment of Advanced Prostate Cancer.* . [S.l: s.n.], 2019.

TERMINI, Deborah; HARTOGH, Danja J Den; JAGLANIAN, Alina. *Curcumin against Prostate Cancer: Current Evidence.* [S.l: s.n.], 2020.

TEVA, Antônio; FERNANDEZ, José Carlos Couto; SILVA, Valmir Laurentino. Capítulo 1- Imunologia. *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde.* [S.l: s.n.], [S.d.]. p. 19–123.

TUNSET, Hanna Maja *et al.* Cytosolic phospholipase A2 alpha regulates TLR signaling and migration in metastatic 4T1 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 19, 2019.

VAINIO, Paula *et al.* Phospholipase PLA2G7, associated with aggressive prostate cancer, promotes prostate cancer cell migration and invasion and is inhibited by statins. *Oncotarget*, v. 2, n. 12, p. 1176–1190, 2011.

VECCHI, Lara *et al.* Phospholipase a2 drives tumorigenesis and cancer aggressiveness through its interaction with annexin a1. *Cells.* [S.l: s.n.], 2021

- WANG, Guocan *et al.* Genetics and biology of prostate cancer. *Genes and Development*, v. 32, n. 17–18, p. 1105–1140, 2018.
- WANG, Xingya; KLEIN, Russell D. Prostaglandin E2 Induces Vascular Endothelial Growth Factor Secretion in Prostate Cancer Cells Through EP2 Receptor-Mediated cAMP Pathway. *Molecular Carcinogenesis*, v. 46, p. 912–923, 2007.
- XU, Yongping *et al.* Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: A review. *Biotechnology Advances*, v. 29, n. 6, p. 860–868, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.003>>.
- YAMASHITA, S. I.; YAMASHITA, J. I.; OGAWA, M. Overexpression of group II phospholipase A2 in human breast cancer tissues is closely associated with their malignant potency. *British Journal of Cancer*, v. 69, n. 6, p. 1166–1170, 1994.
- YANG, Qing *et al.* Androgen receptor signaling is required for androgen-sensitive human prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Cell International*, v. 5, p. 1–10, 2005.
- YING, Zhao *et al.* Enhanced expression of group II phospholipase A2 in human hepatocellular carcinoma. *BBA - Molecular Basis of Disease*, v. 1226, n. 2, p. 201–205, 1994.
- YU, Jessica A. *et al.* Knockdown of secretory phospholipase A2 IIa reduces lung cancer growth in vitro and in vivo. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v. 144, n. 5, p. 1185–1191, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2012.08.003>>.