

Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto Departamento de Química Programa de Pós-Graduação em Química

Efeito da suramina na atividade da fosfolipase A2

secretada humana do grupo IIA

Elisângela Aparecida Aragão

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Química

RIBEIRÃO PRETO -SP

2008



Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto Departamento de Química Programa de Pós-Graduação em Química

Efeito da suramina na atividade da fosfolipase A2

secretada humana do grupo IIA

Elisângela Aparecida Aragão

Orientador: Richard John Ward

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Química

RIBEIRÃO PRETO -SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Aragão, Elisângela Aparecida

Efeito da suramina na atividade da fosfolipase A_2 secretada humana do grupo IIA.

Ribeirão Preto, 2008.

94 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Ward, Richard John.

1. Fosfolipases A_2 . 2. mutagênese sítio dirigida. 3. atividade bactericida. 4. Suramina. 5. danificação de lipossomos

Dedico este trabalho

A Deus pela vida e por estar sempre me protegendo!!!!

"O Senhor é meu pastor e nada me faltará". (SALMO 22) Aos meus pais, Walter e Amélia, pelo imenso amor que sempre me deram, pela confiança, dedicação e pela paciência em todos os momentos da minha vida!!!.

MUITO OBRIGADA POR TUDO!!!!AMO VOCÊS!!!

A toda minha família (irmãos, cunhadas, cunhado e sobrinhos) pelo apoio e pelo carinho e amor que sempre proporcionaram! Muito obrigada por tudo!!!! Amo vocês!!!

A minha segunda família (Júlia, sobrinhos e cunhados) pela paciência, carinho e força!!MUITO OBRIGADA!!!Amo vocês!

Ao Paulo, AMOR DA MINHA VIDA, pela paciência, companheirismo, e pelo carinho e amor que sempre me dedicou! (NÃO VIVO SEM VOCÊ!TE AMO!!!)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Richard John Ward pela amizade, por confiar na minha capacidade, pelo incentivo, compreensão com as minhas dificuldades e pela ótima orientação durante todo o desenvolvimento deste projeto. MUITO OBRIGADA POR TUDO!!!!

À FAPESP pelo apoio financeiro e à CAPES e Pró-reitoria de pesquisa da Universidade de São Paulo pelo apoio financeiro ao laboratório;

Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, pelo qual tenho grande admiração e carinho. Pela amizade, confiança, carinho e incentivo durante todo esse período, disponibilizando seu laboratório integralmente. Muito obrigada por tudo!!!!!!!!!!

À Prof^a.Dra. Lúcia Helena Faccioli pela colaboração nos experimentos de ativação de macrófagos.

Ao Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco do Depto. de Química da FFCLRP pela disponibilização do fluorímetro de seu laboratório;

À Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos pelas sugestões e correções da qualificação;

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva pela colaboração e ajuda fundamental nos experimentos de citometria de fluxo;

Ao Prof. Dr. João Atílho Jorge pela colaboração, fornecendo-nos a cepa de *Micrococcus luteus* (ATCC 9341);

Em especial, à minha amiga Alexandra Ivo de Medeiros pelo carinho, amizade e pela imensa ajuda e orientação durante todos os experimentos de ativação de macrófagos e outras colaborações mais!!! Muito obrigada por tudo que você fez por mim!!!

À minha grande amiga Lucimara Chioato, pela qual tenho total admiração e carinho. Pela amizade e pelos ensinamentos. MUITO OBRIGADA POR TUDO!!!!!

Em especial, à técnica Ivana Aparecida Borin, minha amiga e pessoa fundamental que me ajudou em todos os momentos durante este projeto. Muito obrigada mesmo!!!

Ao técnico Milton Rosa Alves pela amizade e ajuda fundamental nos experimentos realizados e necessidades durante todo o projeto. Ah, Miltinho, e o nosso timão, hein!!!Obrigada por tudo, meu amigo!!

Aos funcionários da secretaria da Química e da CPG da FFCLRP-USP, em especial, à Lâmia, Bel, André, Sônia, Maria e Inês pela amizade e eficiência em todos os momentos. Muito obrigada!!!

Ao pessoal do laboratório de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, em especial, à Adriana Secatto pela atenção, amizade e pela eficiência e dedicação nos experimentos realizados!!!Muito obrigada pela ajuda!!!

Aos amigos Davi Serradella e Marcos Lorenzotti pela amizade e colaboração nos experimentos de simulações de dinâmica molecular!!Muito obrigada!!

À minha amiga Raquel Fonseca (Rach), minha pupila e companheira, pela amizade e pela imensa ajuda em todos os momentos difícieis e de alegria!

À minha amiga Tatiana Lopes Ferreira (Taty Lopes) pela amizade e pela grande ajuda nos experimentos de lipossomos!!Muito obrigada!!!!

Aos amigos de laboratório Laila Deliberto, Juliana Alponti, Leila Spinola, Arthur Henrique Cavalcanti de Oliveira, Roberto Ruller, Carla, Patrícia, Plínio, Gisele, Lucas e Gilvan pela ajuda no laboratório, pelas discussões e pelos momentos de descontração. Valeu galera!!!Muito obrigada!!!

Aos amigos do meu segundo laboratório, Carolina, Tony, Ana Maria, Luís Eduardo, Maitê e Juliana pelos quais tenho total admiração e carinho!!! Pela ajuda durante boa parte do projeto e pelos momentos felizes e descontraídos!!!Pelo cafezinho, baguetadas, enfim, se eu fosse enumerar não acabaria mais!!!!Muito obrigada por tudo!!!

Aos meus sobrinhos, Bianca e Rick, e ao Paulo, meu amor, pela abençoada ajuda na impressão deste trabalho!!!Muito obrigada, meus amores!!!Amo vocês!!

Por fim, a todos os docentes, funcionários, técnicos e amigos da FFCLRP-USP que me ajudaram de alguma forma, mas que pela correria, esqueci de mencionar. O meu muito obrigado!!!

LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
ABSTRACT	V
RESUMO	VI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Estrutura de PLA ₂ s dos grupos I e II	4
1.2. PLA ₂ secretada humana do grupo IIA (hsPLA ₂ gIIA)	8
1.3. Inibidores de PLA ₂ s	10
1.4. Suramina	12
1.5. Base estrutural da interação de Suramina com PLA ₂ s	14
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Mutantes escolhidas	16
3.2. Expressão de hsPLA ₂ gIIA recombinante em <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3){pLysS}	ł
competente	16
3.2.1. Preparação de células competentes de BL21 (DE3){pLvsS}	17
3.2.2. Transformação de BL21 (DE3){pLysS}e indução de expressão	17
3.3. Isolamento dos corpos de inclusão	18
3.4. Modificação química de hsPLA ₂ gIIA e solubilização dos corpos de inclusão	
3.5. Enovelamento da hsPLA ₂ gIIA	20
3.6. Purificação de hsPLA ₂ gIIA recombinante e mutantes	
3.7. Dicroísmo circular	
3.8. Testes de ativação de macrófago através da produção de óxido nítrico	
3.8.1. Manutenção de linhagens celulares	23
3.8.2. Quantificação de nitrito (NO ₂ -)	24
3.8.3. Atividade citotóxica	25
3.9. Atividade bactericida	25
3.9.1. Contagem de Unidades formadoras de colônias (CFU) em placas de Petri	25
3.9.2. Citometria de fluxo	20
3 10. Teste de atividade enzimática através de indicador de ácido graxo livre	29
3 11 Atividade de liberação de calceína encapsulada em lipossomos	31
3 11 1 Preparação dos lipossomos	31
3 11 2 - Dosagem de fosfato dos fosfolipídios	33
3 11 3 Liberação de calceína encansulada em linossomos	33
3 12 Calorimetria de titulação isotérmica (CTI)	34
3 13 Dinâmica molecular	35
3 14 Testes de caracterização dos efeitos de suramina contra as atividades das hsPLA ₂ s	
gIIA recombinantes	37
3 14 1. Teste de afinidade e maneamento do sítio de ligação de suramina em hsPLA ₂	
gIIA medida através de fluorescência	37
3 14 2. Coeficiente de extinção molar de suramina	38
4. RESULTADOS	
4.1. Expressão, enovelamento e purificação da hsPLA ₂ eIIA e mutantes.	
4.1.1. Purificação das proteínas recombinantes mutantes da hsPLA ₂ gIIA	
4.1.2. Dicroísmo circular da hsPLA ₂ gIIA tipo selvagem e mutantes	40
4.2 Teste de atividade enzimática através de indicador de ácido graxo livre	
4.3 Caracterização do efeito da suramina nas atividades biológicas da hsPIA, oIIA	43
4.3.1. Atividade de ativação de macrófago através da produção de óxido nítrico	
,	-

SUMÁRIO

4.3.2. Atividade bactericida	47
4.4. Caracterização do efeito da suramina nas atividades da hsPLA2 gIIA contra	
membranas artificiais	
4.4.1. Atividade de danificação de membranas independente de Ca ²⁺	50
4.4.2. Atividade hidrolítica da hsPLA ₂ gIIA	54
4.5. Caracterização estrutural da interação da suramina com a hsPLA2 gIIA recom	binante
	55
4.5.1. Dinâmica molecular	55
4.5.2. Calorimetria de titulação isotérmica (CTI)	58
4.5.3. Teste de afinidade e mapeamento do sítio de ligação de suramina em hsPLA	A_2 gIIA
medida através de fluorescência	
4.5.4. Avaliação da estrutura secundária da hsPLA ₂ gIIA após ligação com a sura	mina
	64
5. DISCUSSÃO	
6. CONCLUSÕES	
7. REFERÊNCIAS	

ABREVIATURAS

ADIFAB: proteína de ligação de ácido graxo	P-Cho: fosfocolina
intestinal marcada com acrilodan	PCR: reação em cadeia de polimerase
AA: ácido araquidônico	PLA₁: fosfolipase A ₁
BthTX-I: bothropstoxina I	PLA₂s: fosfolipases A ₂
CD: dicroísmo circular	PLB: fosfolipase B
cDNA: DNA complementar	PLC: fosfolipase C
CFU: unidade formadora de colônias	PLD: fosfolipase D
Cho: colina	PM: polimixina
CLAE: cromatografia líquida de alta	PAF-AH: fator de agregação de plaquetas-
eficiência	acetilhidrolase
CONF-1: configuração 1	pET: plasmídeo para expressão pela T7 RNA
CONF-2: configuração 2	polimerase
cPLA ₂ : fosfolipase A ₂ citosólica	PLA ₂ -Asp49: fosfolipase A ₂ com resíduo de
DAG: diacilglicerol	ácido aspártico na posição 49
DO: densidade ótica	PLA ₂ -Lys49: fosfolipase A ₂ com resíduo de
DOPC: dioleoil fosfatidilcolina	lisina na posição 49
DOPG: dioleoil fosfatidilglicerol	SBF: soro bovino fetal
DMSO: dimetilsufóxido	SDS: dodecilsulfato de sódio
DTNB: ácido 5,5´-ditiobis 2-nitrobenzóico	SG: sytox green
EDTA: ácido etilenodiamintetraácetico	sn-2: seqüencialmente numerada no carbono 2
FA: ácido graxo	do fosfolipídeo
GdnHCl: hidrocloreto de guanidina	sPLA₂ : fosfolipase A_2 secretada
HEPES:4-(2-Hidroxiethil)1-ácido	SRI: sítio de reconhecimento interfacial
piperazineethanesulfonico	SUR-1: extremidade da suramina 1
hsPLA ₂ gIIA: fosfolipase A ₂ secretada	SUR-2: extremidade da suramina 2
humana do grupo IIA tipo selvagem	UV: ultravioleta
i-face: sítio de reconhecimento interfacial	CTI: calorimetria de titulação isotérmica
iPLA₂: fosfolipase A ₂ independente de Ca ²⁺	DM: dinâmica molecular
IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo	IPI: potencial intermolecular de interação
LysoPC: lisofosfolipídio	PE: energia potencial
LPS: lipopolissacarídeo	NO: óxido nítrico
MTT: 2,5 – Difenil brometo de tetrazolium	
NEED: naftiletilenodiamina	
NTSB: 2-nitro-5-(sulphotio)-benzoato	
PA: ácido fosfatídico	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Hidrólise de fosfatidilcolina pela PLA ₁ , PLA ₂ , PLB, PLC e PLD, e os respectivos produtos da reação (em parênteses)1
FIGURA 2: Representação em fita da estrutura tridimensional de uma PLA ₂ de <i>Crotalus atrox</i> (Brunie, Bolin <i>et al.</i> , 1985)
FIGURA 3: Mecanismo de tríade catalítica de PLA ₂ s. (A) Representação em fita de uma PLA ₂ -Asp49 de <i>Gloydius halys pallas</i> (Zhao, Song <i>et al.</i> , 1998); (B) Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para PLA ₂ s7
FIGURA 4: Estrutura da suramina, um naftiluréia polissulfonado13
FIGURA 5: Esquema ilustrativo da desnaturação e modificação química de proteínas sob a forma de corpos de inclusão19
FIGURA 6: Esquema ilustrativo do ensaio bactericida26
FIGURA 7: Representação esquemática de um citômetro de fluxo27
FIGURA 8: Titulação monitorada por fluorescência do ADIFAB com ácido oléico a 25°C
FIGURA 9: Diagrama de formação de lipossomos pelo método de evaporação de fase reversa32
FIGURA 10: Esquema ilustrativo do teste de liberação de calceína encapsulada em lipossomo
FIGURA 11: Curva padrão da absorbância de suramina38
FIGURA 12: Cromatograma da purificação da hsPLA ₂ gIIA tipo selvagem e mutantes em coluna de troca catiônica Source 15S
FIGURA 13: Espectro de dicroísmo circular na região UV-distante de hsPLA ₂ gIIA tipo selvagem e proteínas mutantes41
FIGURA 14: Hidrólise fosfolipídica da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e proteínas mutadas no sítio ativo na presença de Ca²⁺. Razão da intensidade de fluorescência (I) em 505 e 425 nm após a adição de 0,1 μg/mL da hsPLA ₂ gIIA tipo selvagem e 30 μg/mL das mutantes G30S, H48Q e D49K
FIGURA 15: Atividade hidrolítica da hsPLA ₂ gIIA tipo selvagem e proteínas mutadas no sítio ativo na presença de Ca ²⁺ 43
FIGURA 16: Avaliação da ativação de células de macrófagos U937 pela ação da hsPLA ₂ gIIA através da produção de nitrito44

FIGURA 17: Avaliação da ativação de células de macrófagos RAW 264.7 pela ação da hsPLA ₂ gIIA através da produção de nitrito45
FIGURA 18: Avaliação da ativação de células de macrófagos RAW 264.7 pela ação da hsPLA ₂ gIIA tipo selvagem e mutantes através da produção de nitrito
FIGURA 19: Efeito da suramina na atividade de ativação de macrófagos RAW 264.7 da hsPLA ₂ gIIA tipo selvagem47
FIGURA 20: Efeito de suramina na atividade bactericida da hsPLA ₂ gIIA tipo selvagem
FIGURA 21: Histogramas do efeito de suramina na atividade bactericida da hsPLA ₂ gIIA contra <i>M.luteus</i> fornecidos através da citometria de fluxo49
FIGURA 22: Porcentagem de liberação de calceína induzida pela hsPLA ₂ gIIA51
FIGURA 23: Efeito de suramina na liberação de calceína induzida por hsPLA ₂ gIIA em lipossomos compostos de 1:1 DOPC:DOPG
FIGURA 24: Efeito da suramina na liberação de calceína induzida por hsPLA ₂ gIIA e mutantes em lipossomos compostos de 1:1 DOPC: DOPG53
FIGURA 25: Porcentagem de inibição da atividade de liberação de calceína da hsPLA ₂ gIIA tipo selvagem e mutantes, em lipossomos compostos de 1:1 DOPC:DOPG, pela ação da suramina
FIGURA 26: Efeito da suramina na atividade hidrolítica da hsPLA ₂ gIIA tipo selvagem.
FIGURA 27: (A) Estrutura química da suramina mostrando a divisão da molécula (regiões denominadas de SUR-1 e SUR-2) para análise dos dados de simulação molecular. (B) e (C) Representação em superfície sólida do complexo hsPLA ₂ gIIA/suramina com vista para o sítio de reconhecimento interfacial (SRI) da proteína, mostrando as regiões SUR-1 (verde) e SUR-2 (vermelho) da suramina
FIGURA 28: Trajetórias da energia potencial (PE) para o complexo hsPLA ₂ gIIA/suramina58
FIGURA 29: Curva calorimétrica da interação entre a suramina com a hsPLA ₂ gIIA obtida pela técnica de calorimetria de titulação isotérmica (CTI)59
FIGURA 30: Intensidade de fluorescência da interação da suramina com hsPLA ₂ gIIA pela variação do comprimento de onda (λ) de emissão da suramina60
FIGURA 31: Afinidade da suramina com hsPLA ₂ gIIA pela concentração de suramina.
FIGURA 32: Intensidade de fluorescência da afinidade da suramina com hsPLA ₂ gIIA tipo selvagem e mutantes pela concentração de suramina62

FIGURA 34: Espectro de dicroísmo circular na região UV-distante de hsPLA₂ gIIA tipo selvagem, na ausência e na presença de suramina: inversão da posição da amostra.....66

RESUMO

As fosfolipases A₂ (PLA₂s, ou fosfatidil-acil hidrolases EC 3.1.1.4) catalisam especificamente a hidrólise das ligações ácido-éster na posição *sn-2* de glicerofosfolipídios liberando, como produto da catálise, ácidos graxos e lisofosfolipídio. São encontradas em plantas, mamíferos e em veneno de animais vertebrados e invertebrados e estão envolvidas em uma ampla variedade de processos fisiológicos. A fosfolipase A₂ secretada humana do grupo IIA (hsPLA₂ gIIA) é uma proteína de fase aguda da resposta imunológica, pois sua expressão é induzida por endotoxinas e citocinas via processos autócrinos e/ou parácrinos durante processos inflamatórios de relevância clínica. A hsPLA₂ gIIA mostra efeito bactericida contra infecção por *Staphylococcus aureus*, e tem marcada preferência por fosfolipídios aniônicos tais como fosfatidilglicerol (PG) encontrados em membranas bacterianas.

Uma grande variedade de inibidores de PLA₂ do grupo IIA foi descrita na literatura, incluindo substâncias polianiônicas que atuam contra os efeitos inflamatórios destas enzimas. Suramina é um derivado de naftiluréia polissulfonado que recentemente mostrou ligação com os resíduos catiônicos no sítio de reconhecimento interfacial de Bothropstoxina-I (BthTX-I), uma PLA₂-Lys49 isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*, inibindo a atividade miotóxica da proteína. Devido ao tipo de interação diferenciada da suramina com BthTX-I em relação aos inibidores competitivos de PLA₂, nós avaliamos a especificidade de ligação da suramina na hsPLA₂ gIIA como um modelo para estudar este novo tipo de inibidor de PLA₂s.

O efeito da suramina nas atividades biológicas e de membranas artificiais da hsPLA₂ gIIA foi avaliado. A suramina aboliu tanto a atividade hidrolítica da hsPLA₂ gIIA quanto a atividade de danificação de membranas artificiais Ca²⁺ independente. Embora a suramina não tenha inibido a atividade bactericida da hsPLA₂ gIIA contra a linhagem *Micrococcus luteus*, a ativação de macrófagos foi abolida pela mesma de maneira dependente de hidrólise. Além disso, técnicas de simulação de dinâmica molecular, calorimetria de titulação isotérmica e mutagênese sítio dirigida foram utilizadas para mapear os sítios de ligação da suramina na proteína. A interação da suramina com a hsPLA₂ gIIA resultou de interações eletrostáticas entre grupos sulfonados com cadeias laterais de aminoácidos da região do sítio ativo e dos resíduos em torno das posições 15 e 116 localizados, respectivamente, na N- e C-terminal. Portanto, estes resultados permitem sugerir que a suramina pode atuar como inibidor de sPLA₂s.

ABSTRACT

Suramin is a polysulphonated napthylurea used as an antiprotozoal drug that presents inhibitory activity against a broad range of enzymes. We have evaluated the effect of suramin against the artificial and biological activities of the secreted human group IIA phospholipase A₂ (hsPLA₂ GIIA), a protein involved in inflammatory processes. To map the suramin binding sites on the hsPLA2 gIIA, proteins with mutations in the active site region and in the protein surface that makes contact with the phospholipids membrane were expressed in E. coli and refolded from inclusion bodies. The activation of macrophage cell line RAW 264.7 by hsPLA₂ GIIA was monitored by nitric oxide release, and bactericidal activity of the protein against Micrococcus luteus was evaluated by colony counting and by flow cytometry. The hydrolytic activity of the hsPLA₂ GIIA against lipossomes composed of a mixture of dioleoylphosphatidylcholine/dioleoylphosphatidylglycerol (DOPC/DOPG) was inhibited by a concentration of 100 nM suramin. The activation of macrophages by hsPLA₂ GIIA was abolished at protein/suramin molar ratios where the hydrolytic activity of the enzyme was inhibited. In contrast, both the bactericidal activity of hsPLA2 GIIA against Micrococcus luteus and permeabilization of the bacterial inner membrane were unaffected by suramin concentrations up to 50 µM. The affinity of interaction of the suramin with hsPLA₂ gIIA was evaluated by suramine fluorescence and the mutants K15A, K38A, R54A and K123A presented a reduced affinity. The binding of the suramin/hsPLA2gIIA complex was investigated by molecular dynamics simulations, which indicated two conformations of the bound inhibitor, which involve cationic amino-acid side chains in the active-site region and residues around positions 15 and 116 located in the N- and C-termini respectively in the substrate recognition surface. These results were correlated with isothermal titration calorimetry data, which demonstrated 2.7 suramin-binding sites on the hsPLA₂gIIA. These results suggested that suramin represents a novel class of phospholipase A2 inhibitor.

1. INTRODUÇÃO

As fosfolipases são enzimas hidrolíticas que estão agrupadas nas famílias A₁ (PLA₁), A₂ (PLA₂), B (PLB), C (PLC) e D (PLD) de acordo com a ligação hidrolisada no fosfolipídio (figura 1). As fosfolipases A₂ (PLA₂) ou fosfatidil-acil hidrolases (EC 3.1.1.4) catalisam especificamente a hidrólise das ligações ácido-éster na posição *sn-2* de glicerofosfolipídios liberando, como produto da catálise, ácidos graxos e lisofosfolipídios (Van Deenen e De Haas, 1963), sendo a hidrólise realçada sobre substratos agregados micelares e lamelares, em membranas ou ainda, na interface água-lipídio (Ramirez e Jain, 1991).

As PLA₂s estão envolvidas em uma ampla variedade de processos fisiológicos incluindo digestão fosfolipídica, remodelagem de membranas, defesa do hospedeiro e também participam de processos patofisiológicos através da produção de mediadores lipídicos tais como prostaglandinas e leucotrienos. O fato de exibirem função central em diversos processos celulares faz com que as PLA₂s sejam alvos de muitos estudos, com o objetivo de correlacionar estrutura com função da enzima.



FIGURA 1: Hidrólise de fosfatidilcolina pela PLA₁, PLA₂, PLB, PLC e PLD, e os respectivos produtos da reação (em parênteses). As fosfolipases A_2 hidrolisam especificamente a ligação éster *sn2* de fosfolipídios e liberam, como produto da catálise, ácido graxo e lisofosfolipídio. Cho, colina; DAG, diacilglicerol; P-Cho, fosfocolina, FA, ácido graxo. Em verde estão destacados os ácidos graxos *sn*-1 e *sn*-2 e em azul o grupo polar colina associado ao fosfato.

As fosfolipases A₂ constituem uma classe diversificada de enzimas com relação à localização, regulação, mecanismo, seqüência de aminoácidos e estrutura. Existem cinco principais subfamílias de fosfolipases A₂: PLA₂s secretadas (sPLA₂), PLA₂s citosólicas (cPLA₂), PLA₂s independente de Ca²⁺ (iPLA₂), as PAF-acetilhidrolases (PAF-AH) e as PLA₂s lisossomais. A revisão mais recente (Schaloske e Dennis, 2006) classifica as PLA₂s descritas na literatura dentro de 15 grupos de acordo com a similaridade da seqüência de aminoácidos e pontes dissulfeto.

As PLA₂ secretadas compreendem os grupos I, II, III, V, IX, X, XI e XII, XIII e XIV. São enzimas interfaciais encontradas em plantas, mamíferos e em veneno de animais vertebrados e invertebrados, de baixo peso molecular, dependentes de Ca²⁺ e estão implicadas na digestão fosfolipídica, geração de mediadores lipídicos, proliferação celular, exocitose, atividade bactericida, câncer e doenças inflamatórias. As sPLA₂s do grupo I são enzimas encontradas tanto no suco pancreático de mamíferos como no veneno de serpentes das famílias Elapidae e Hidrophidae. Apresentam massa molecular de 13 a 15 kDa e 14 resíduos de cisteínas que formam 7 pontes dissulfeto. Ao grupo II pertencem as sPLA₂s do veneno de serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae e do fluido sinovial de mamíferos (grupo IIA), do veneno da víbora Gaboon (grupo IIB), do testículo de camundongos (grupo IIC), do baço e pâncreas de camundongos/humanos (grupo IID), do útero, coração e cérebro de camundongo/humano (grupo IIE) e do embrião e testículo de camundongos (grupo IIF). São enzimas que apresentam massa molecular de 13-17 kDa e contém de 6 a 8 pontes dissulfeto. As proteínas dos grupos I e II apresentam uma grande similaridade em suas seqüências de aminoácidos e homologia estrutural. As sPLA₂s do grupo III incluem enzimas dos venenos de abelhas, lagartos e também são encontradas nos exudados inflamatórios e grânulos de plaquetas e mastócitos. O grupo V é composto de sPLA2s encontradas em macrófagos, coração e pulmão de mamíferos e são expressas principalmente em resposta a estímulos inflamatórios. Ao grupo IX pertencem as sPLA₂s isoladas do veneno de um gastrópodo marinho. O grupo X compreende sPLA₂s isoladas do timo, baço e leucócito humano. O grupo XI apresenta sPLA₂s isoladas de plantas e ao grupo XII pertencem enzimas de 20 kDa isoladas de células T-helper. O grupo XIII pertencem enzimas isoladas de Parvovírus com massas moleculares inferiores a 10 kDa e sem nenhuma ponte dissulfeto. Finalmente ao grupo XIV pertencem as enzimas isoladas de bactérias e fungos simbióticos *Tuber borchii* contendo apenas duas pontes dissulfeto.

Em contraste as PLA₂s secretadas, as PLA₂s citosólicas compreendem o grupo IV composto de enzimas que apresentam de 61 a 114 kDa e são encontradas no baço e tireóide de humanos (grupo IVF), no cérebro e coração humanos (grupo IVE), em células epiteliais humanas (grupo IVD), no músculo esquelético e cardíaco de humanos (grupo IVC), no cérebro, coração e fígado de humanos (grupo IVB) e no fígado de rato e plaquetas de humanos (grupo IVA). As PLA₂s citosólicas têm recebido mais atenção como reguladoras da biossíntese do fator de agregação de plaqueta (PAF) e eicosanóides, devido à liberação seletiva de ácido araquidônico. Estas enzimas sofrem translocações dependentes de Ca²⁺ do citosol para as membranas do retículo endoplasmático e perinuclear, onde estão localizadas várias enzimas associadas com a síntese de eicosanoídes, como ciclooxigenases e lipoxigenases.

As iPLA₂ (grupo VI) exibem função central na remodelagem de fosfolipídios. São PLA₂s citosólicas de massa molecular entre 84-90 kDa, independentes de Ca²⁺ e são encontradas no músculo esquelético/cardíaco, testículo, linfócito e macrófago de humanos. As PAF-AHs (grupos VII e VIII) pertencem a um subtipo de fosfolipase A₂ que degrada especificamente PAF e lipídios oxidados relacionados. Os grupos VII e VIII compreendem enzimas com atividade de PAF acetilhidrolases sendo pertencentes ao grupo VII àquelas que apresentam de 40 a 45 kDa e são encontradas tanto no plasma quanto intracelularmente no fígado e rim de humano/bovino e ao grupo grupo VIII aquelas com 26 kDa encontradas no cérebro humano.

As PLA₂s lisossomais (grupo XV) apresentam massas moleculares em torno de 45 kDa e são encontradas no cérebro bovino, humano e de camundongo. Foi primeiramente denominada de 1–O acilceramida sintase, pois promove a esterificação do grupo acil com o grupo hidrolixa na posição C -1 da ceramida usando fosfolipídios como doador de grupos acil.

1.1. Estrutura de PLA₂s dos grupos I e II

Estudos cristalográficos e espectroscópicos contribuíram significativamente para a elucidação de um modelo para a catálise das PLA₂s (Scott *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1990a; Scott *et al.*, 1990b; Verheij *et al.*, 1981). As enzimas que incluem um par aspartato-histidina no sítio ativo são tipicamente extracelulares de baixo peso molecular e requerem concentrações milimolares de Ca²⁺ para exercerem sua atividade catalítica. Por outro lado, os grupos que utilizam uma serina no sítio catalítico são tipicamente enzimas maiores, intracelulares que utilizam uma serina nucleofílica para a clivagem hidrolítica e que não apresentam nenhuma ligação dissulfeto e nenhum requerimento de Ca²⁺ para a catálise.

As estruturas tridimensionais das proteínas dos grupos I, II e III na presença e ausência do cofator Ca^{2+} e de inibidores específicos foram resolvidas por cristalografia de raio-X (Scott *et al.*, 1990a; Scott *et al.*, 1990b). Como apresentado na figura 2 as PLA₂s apresentam duas α hélices anti-paralelas conservadas (onde se localizam os resíduos do sítio ativo), associadas com uma alça rica em resíduos de glicina, que está envolvida na ligação do Ca²⁺ (Arni e Ward, 1996; Scott *et al.*, 1990a; Scott *et al.*, 1990b). Sabe-se que as PLA₂s de venenos apresentam especificidade por substratos fosfolipídicos, as quais são determinadas pela topologia de superfície específica da região da proteína que interage com a superfície da membrana. Estudos cristalográficos, fluorimétricos e de NMR propuseram uma superfície protéica de ligação interfacial comum para as PLA₂s. Esta superfície inclui o sítio ativo (Ramirez e Jain, 1991; Scott e Sigler, 1994) e nos grupos I/II é definida por uma fenda na superfície hidrofóbica altamente conservada que liga a cadeia de ácido graxo do substrato fosfolipídico, juntamente com um anel de resíduos carregados e polares. Esta superfície é denominada de sítio de reconhecimento interfacial, SRI (Pieterson *et al.*, 1974) ou i-face (Ramirez e Jain, 1991).



FIGURA 2: Representação em fita da estrutura tridimensional de uma PLA₂ de *Crotalus atrox* (Brunie *et al.*, 1985). Estrutura tridimensional típica das classes I e II de PLA₂s. As principais hélices e alças estão indicadas.

Utilizando a numeração de homologia dos grupos I e II, constatou-se que as posições dos resíduos His48, Asp49, Tyr52 e Asp99 são altamente conservadas no sítio ativo dos dois grupos, sendo que, resíduos estruturalmente conservados são encontrados no grupo III (Renetseder *et al.*, 1985). O grupo carboxila do resíduo de aspartato presente na posição 49,

juntamente com três oxigênios carbonil da cadeia principal dos resíduos Tyr28, Gly30 e Gly32, estão envolvidos na ligação do Ca²⁺ (Thunnissen *et al.*, 1990), o cofator no mecanismo de hidrólise (Scott *et al.*, 1990b; Verheij *et al.*, 1981). Este cofator orienta tanto o substrato fosfolipídico, como estabiliza o intermediário catalítico tetraédrico (Scott e Sigler, 1994; Scott *et al.*, 1990b; Thunnissen *et al.*, 1990) e, na sua ausência, as PLA₂s são inativas.

O mecanismo proposto (Verheij *et al.*, 1981) e revisado (Berg *et al.*, 2001) sugere que os resíduos Asp99, His48 e uma molécula de água formam uma tríade catalítica (figura 3A). A seqüência do mecanismo catalítico proposto ocorre em 3 etapas (figura 3B): (1) desprotonação da molécula de água pela díade catalítica His48/Asp99; (2) ataque nucleofílico na ligação ester *sn-2* do glicerofosfolipídio pela água desprotonada; e a formação do intermediário tetraédrico, que é estabilizado pelo cofator Ca^{2+} ; (3) e finalmente, colapso do intermediário da reação, com a liberação dos produtos da catálise, ácido graxo e lisofosfolipídio. O passo limitante da reação seria a formação do intermediário tetraédrico quando o grupo δ N do H48 é protonado.



FIGURA 3: Mecanismo de tríade catalítica de PLA₂s. (A) Representação em fita de uma PLA₂-Asp49 de *Gloydius halys pallas* (Zhao *et al.*, 1998); (B) Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para PLA₂s. Asp 99, His48 e uma molécula de água formam uma tríade catalítica, na qual a desprotonação da molécula de água pelo resíduo de His48 gera o ataque nucleofílico (ver texto para detalhes).

1.2. PLA₂ secretada humana do grupo IIA (hsPLA₂ gIIA)

A fosfolipase A₂ secretada humana do grupo IIA (hsPLA₂ gIIA) foi inicialmente caracterizada como enzima secretada do fluido sinovial (Kramer *et al.*, 1989; Seilhamer *et al.*, 1989). Entretanto estudos subseqüentes têm demonstrado que a hsPLA₂ gIIA apresenta um amplo padrão de expressão em tecidos humanos sendo encontrada em macrófagos (Inada *et al.*, 1991), células Paneth do intestino (Nevalainen e Haapanen, 1993; Qu *et al.*, 1996), células da glândula lacrimal (Aho *et al.*, 1996; Nevalainen *et al.*, 1994), plaquetas (Kramer *et al.*, 1989), neutrófilos (Wright *et al.*, 1990) e mastócitos (Murakami *et al.*, 1992).

A hsPLA₂ gIIA é considerada uma proteína de fase aguda da resposta imunológica, pois sua expressão é induzida por endotoxinas e citocinas via processos autócrinos e/ou parácrinos durante processos inflamatórios (Crowl *et al.*, 1991). Sabe-se que a ativação da resposta imune inata pode ser induzida através de diferentes estímulos, como agentes infecciosos e seus produtos, materiais tóxicos, traumas, partículas ou células estranhas, que resultam na síntese de diferentes mediadores.

O principal reflexo da resposta imune inata é o processo inflamatório que compreende uma série de eventos complexos e culminam em alteração da microvasculatura e no recrutamento celular, e que tem como sinais cardinais a dor, o calor, o rubor, o tumor (ou edema). Alguns estudos têm mostrado que PLA₂s secretadas (sPLA₂s) contribuem para a biosíntese de mediadores lipídios em células inflamatórias, tais como: mastócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (Triggiani *et al.*, 2006). Entre estes mediadores podemos citar citocinas, quimiocinas, proteínas do sistema do complemento e os derivados dos fosfolipídeos de membrana, como o Fator Ativador de Plaquetas (PAF), metabólitos do ácido araquidônico (AA) ou leucotrienos e prostaglandinas (Funk, 2001; Luster e Tager, 2004; Triggiani *et al.*, 2006). O mecanismo, pelo qual as sPLA₂s atuam nestes processos, ainda é desconhecido (Funk, 2001; Luster e Tager, 2004; Triggiani *et al.*, 2006). Em adição, a hsPLA₂ gIIA apresenta efeito bactericida contra infecção por *Staphylococcus aureus* (Laine *et al.*, 1999). Por ser uma proteína básica que apresenta peso molecular em torno de 14 kD e que apresenta um alto número de aminoácidos carregados positivamente localizados na sua superfície (pI>10.5), ela apresenta uma marcada preferência por fosfolipídios aniônicos tais como fosfatidilglicerol (PG) encontrados em membranas bacterianas (Buckland e Wilton, 2000). Por outro lado, a hsPLA₂ gIIA liga-se fracamente a interfaces zwiteriônicas presente em membranas celulares de eucariotos (Bayburt *et al.*, 1993).

A linhagem *Micrococcus luteus (M. luteus)* foi utilizada como sistema modelo para avaliar o mecanismo bactericida apresentado pela hsPLA₂ gIIA (Buckland e Wilton, 2000). Foi sugerido que a atividade bactericida depende da habilidade da hsPLA₂ gIIA em penetrar na parede celular de *M. luteus* e hidrolisar fosfolipídios da membrana celular bacteriana, sugerindo que a natureza catiônica da enzima humana é uma determinante estrutural deste processo (Beers *et al.*, 2002). Entretanto, o tratamento de *M. luteus* com baixas concentrações da enzima humana falhou em matar a bactéria apesar da extensiva hidrólise de fosfolipídios da bactéria, evidenciando que a hidrólise sozinha não é suficiente para matar a bactéria (Beers *et al.*, 2002). Estudos realizados em nosso laboratório (Chioato, 2004) através da utilização de mutagênese sítio dirigida de hsPLA₂ gIIA mostrou que a mutação no sítio ativo da enzima, que diminui a atividade catalítica, manteve um efeito bactericida significativo contra linhagem *M. luteus* indicando que o efeito bactericida tem contribuição de mecanismos dependente e independente da catálise.

Além disso, a hsPLA₂ gIIA mostrou sua participação no processo de ativação de macrófagos através da expressão de óxido nítrico (Baek *et al.*, 2000; Baek *et al.*, 2001). Esse efeito pode ser importante em condições patogênicas quando os níveis de hsPLA₂ gIIA são elevados. Embora o mecanismo desse processo seja desconhecido, evidências sugerem que a

atividade catalítica das sPLA₂s é o principal mecanismo de ação em tais efeitos (Gelb *et al.*, 1995; Kudo e Murakami, 2002). Entretanto, alguns autores relatam que a ativação de células inflamatórias é provocada pela interação das sPLA₂s com receptores específicos (Lambeau e Lazdunski, 1999; Triggiani *et al.*, 2006; Triggiani *et al.*, 2005; Valentin e Lambeau, 2000)). Por exemplo, sPLA₂s cataliticamente inativas ainda induzem inflamação (Fonteh *et al.*, 2001; Triggiani *et al.*, 2003). A atividade de danificação de membranas artificiais pela hsPLA₂ gIIA independente da catálise também foi recentemente observada (Chioato, 2004). Com base nos dados anteriores, uma possível correlação entre as atividades de danificação de membranas artificiais de membranas artificiais e biológicas por mecanismos independentes da catálise merece ser investigada.

1.3. Inibidores de PLA₂s

Uma grande variedade de inibidores de PLA₂s é encontrada na literatura, atuando contra os efeitos inflamatórios destas enzimas (Chandra *et al.*, 2002a; Church *et al.*, 2001; Jabeen *et al.*, 2005; Mihelich e Schevitz, 1999; Ripka *et al.*, 1989; Singh *et al.*, 2005). A maioria é composta de inibidores competitivos que competem com o substrato fosfolipídico pelo sítio ativo da enzima. Muitos outros compostos também foram identificados como inibidores competitivos de PLA₂s, dentre eles estão: compostos indólicos (Bernard *et al.*, 2001; Dillard *et al.*, 1996; Draheim *et al.*, 1996; Oslund *et al.*, 2008; Sawyer *et al.*, 2005), peptídeos sintéticos (Chandra *et al.*, 2002b; Singh *et al.*, 2003), vitamina E (Chandra *et al.*, 2002a; Pentland *et al.*, 1992; Traber e Packer, 1995), flavonóides (Lattig *et al.*, 2007; Lindahl e Tagesson, 1997) e outras substâncias de extrato de plantas (Deepa e Veerabasappa Gowda, 2002; Mishra *et al.*, 2000). Estes compostos se ligam não covalentemente no sítio catalítico da enzima, porém identificou-se o composto p-bromo-fenacil-brometo (Renetseder *et al.*, 1988), o qual inibiu a fosfolipase A_2 pancreática bovina, através da interação covalente com o resíduo His48.

Numerosas proteínas endógenas isoladas do sangue de serpentes e de alguns mamíferos têm ação de inibidores naturais de PLA₂s e neutralizam a atividade hemorrágica, neurotóxica ou miotóxica (Faure, 2000; Lizano *et al.*, 2003). Três tipos de inibidores protéicos de PLA₂ foram classificados como α , $\beta \in \gamma$ - PLIs baseado nas suas características estruturais (Ohkura *et al.*, 1997). O mecanismo de ação destes inibidores de PLA₂s ocorre através da formação do complexo enzima-inibidor ligado não-covalentemente (Kihara, 1976; Nicolas *et al.*, 1995). Uma vez que estes inibidores protéicos são relativamente grandes (9-12 kDa), a interação com a PLA₂ pode resultar em impedimento ao acesso do substrato para o sítio ativo, ou bloqueio físico do i-face.

A heparina, um polissacarídeo sulfonado, também inibiu a atividade citotóxica de Miotoxina II, uma PLA₂-Lys49 do veneno de *B. asper* (BaspMTII) sobre células endoteliais (Lomonte *et al.*, 1994b). Estudos prévios mostraram que a heparina e outros poliânions são capazes de inibir mionecrose induzida por venenos de serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae, os quais contêm miotoxinas PLA₂s, incluindo BthTX-I (Lomonte *et al.*, 1994a; Melo *et al.*, 1993; Melo e Suarez-Kurtz, 1988). Esta inibição tem sido descrita pela formação de um complexo ácido-base entre os compostos polianiônicos e as miotoxinas básicas de venenos (Lomonte *et al.*, 1994a; Melo *et al.*, 1994a; Melo *et al.*, 1993). Além disso, dados obtidos mostraram que a heparina apresentou alta atividade de inibição da hidrólise de substratos micelares pela fosfolipase A₂ secretada humana do grupo IIA -hsPLA₂ gIIA – (Dua e Cho, 1994). A heparina não inibiu a hidrólise de substratos monoméricos pela PLA₂, sugerindo um mecanismo de inibição não-competitiva. Portanto, a caracterização de novos inibidores de PLA₂ pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra os processos patológicos provocados por essas enzimas.

1.4. Suramina

Suramina, um derivado de naftiluréia polissulfonado altamente carregado (figura 4), é um dos primeiros agentes terapêuticos sintéticos, desenvolvido e utilizado no tratamento de doenças de tripanossomíase africana e oncorcecíase (Burch e Ashburn, 1951; Cherry, 1960; Den Hertog *et al.*, 1989; Nakazawa *et al.*, 1991; Schneider, 1963). A suramina também tem sido utilizada clinicamente no tratamento de algumas doenças, possuindo um papel importante contra linfoma folicular (Arbuck *et al.*, 1997), AIDS (Cheson *et al.*, 1987) e alguns tipos de câncer como o de próstata (Eisenberger *et al.*, 1993), renal (Dreicer *et al.*, 1999; Larocca *et al.*, 1991), pâncreas (Bhargava *et al.*, 2007) e mama (Gradishar *et al.*, 2000). Por possuir a capacidade de ligação em uma variedade de proteínas, tais como, fator de crescimento derivado de plaquetas (Hosang, 1985; Huang e Huang, 1988), fator de crescimento de fibroblastos (Rifkin e Moscatelli, 1989; Zhu *et al.*, 2005) e fator de crescimento endotelial vascular (Bhargava *et al.*, 2007), os quais induzem a angiogênese, a suramina apresenta um efeito inibitório contra esses fatores de crescimento, uma vez que promove a inibição da ligação destes com seus receptores e, dessa maneira, impede a migração e proliferação de células endoteliais (Bhargava *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2005).



FIGURA 4: Estrutura da suramina, um naftiluréia polissulfonado. Peso molecular de 1429g e 6 grupos sulfonados por molécula de suramina.

Em adição, a suramina atua como antagonista de todos os subtipos de receptor purino P_2 (Den Hertog *et al.*, 1989; Henning *et al.*, 1992; Nakazawa *et al.*, 1991) e inibe síntese de DNA (Jindal *et al.*, 1990), atividade da topoisomerase (Funayama *et al.*, 1993) e transcriptase reversa retroviral (Tan *et al.*, 1992). Ademais, a suramina também pode inibir o bloqueio neuromuscular induzido por neurotoxinas pré-sinápticas tais como β -bungarotoxina e crotoxina (Lin-Shiau e Lin, 1999) e reverter os efeitos de bloqueadores neuromusculares não-despolarizantes (Henning *et al.*, 1992).

Sabe-se que a suramina possui uma variedade de atividades pela ligação com proteínas básicas (Freissmuth *et al.*, 1996; Freissmuth *et al.*, 1999). Esse efeito é conseqüência da forte natureza polianiônica da suramina, que facilita a interação estável com regiões catiônicas nas superfícies destas proteínas. A forte ligação por proteínas do plasma em pH fisiológico resulta na retirada de aproximadamente 85 % do total de suramina em concentrações terapêuticas, tipicamente em torno de 1 mM (Vansterkenburg *et al.*, 1993).

1.5. Base estrutural da interação de Suramina com PLA₂s

Sabe-se que a suramina reduz a atividade miotóxica in vivo do veneno de B. jararacussu (Arruda et al., 2002). A pré-incubação de suramina com a PLA2-Lys49 (BthTX-I) a 37°C por 15 minutos aboliu as atividades de paralisação muscular e danificação muscular induzidas por BthTX-I (De Oliveira et al., 2003). Além disso, a estrutura cristalina de Miotoxina II de *B. asper* complexada com a suramina, revelou que a esta forma contatos com a alça de ligação do cálcio e com os aminoácidos da alça que ligam a segunda longa hélice à β-folha da enzima (Murakami et al., 2004). Estes contatos são mediados pelas interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (Murakami et al., 2005). A ligação da suramina aniônica com os resíduos catiônicos do sítio de reconhecimento interfacial da membrana fosfolipídica da proteína neutraliza as cargas positivas desta região e em adição impede estéricamente o acesso de fosfolipídios para o sítio de ligação do substrato. Este modo de interação envolvendo resíduos específicos da PLA₂-Lys49 sugere que esta família de compostos pode ser utilizada como inibidores de PLA₂s. Como a hsPLA₂ gIIA é uma proteína de fase aguda envolvida em uma série de processos inflamatórios e a suramina mostrou-se um inibidor seletivo de PLA₂, a investigação da especificidade da interação da suramina com a hsPLA₂ gIIA, abre a possibilidade de desenvolvimento de novos tipos de inibidores de PLA₂s.

2. OBJETIVOS

2.1. Caracterização da afinidade da suramina pela hsPLA₂ gIIA tipo selvagem, através de medidas de fluorescência e avaliação do efeito da suramina nas atividades apresentadas pela proteína. As atividades a serem estudadas serão: atividade catalítica da enzima; efeito bactericida; danificação de membranas artificiais e atividade de ativação de macrófagos.

2.2. Mapear o sítio de ligação de suramina em $hsPLA_2$ gIIA através da avaliação do efeito de mutagênese sítio dirigida dos resíduos catiônicos na afinidade da proteína pela suramina, utilizando a técnica de fluorescência.

2.3. Avaliar o efeito da suramina na atividade independente de catálise de $hsPLA_2$ gIIA em macrófagos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Mutantes escolhidas

As proteínas mutantes da hsPLA₂ gIIA (R7A, K15A, K38A, K53A, K54A, K57A, R58A, ΔK57/R58, K115A, K116A e K123A) foram geradas através da técnica de mutagênese por reação em cadeia de polimerase (Nelson e Long, 1989) na tese de Doutorado de Lucimara Chioato (Chioato, 2004) e utilizadas no projeto para mapear o sítio de ligação da suramina na proteína através do teste de afinidade de suramina medida por fluorescência. Além disso, as mutações H48Q, D49K e G30S na região do sítio ativo da proteína também foram realizadas com o objetivo de eliminar a atividade catalítica da enzima, para sabermos se a proteína ainda terá efeito depois de não mais apresentar atividade hidrolítica. Os DNAs que codificam as mutantes da hsPLA₂ gIIA foram clonadas no vetor de expressão pET3a. Estes construtos foram transformados na linhagem de *E. coli* BL21(DE3)[pLysS] para a produção de hsPLA₂ gIIA heteróloga.

3.2. Expressão de hsPLA₂ gIIA recombinante em *Escherichia coli* BL21 (DE3){pLysS} competente

O vetor de expressão pET-3a, contendo as seqüências codificadoras mutadas de hsPLA₂ gIIA, foi utilizado para transformar *Escherichia coli* da linhagem BL21(DE3) {pLysS} competente. A linhagem de *Escherichia coli* BL21(DE3){pLysS} é lisógena do bacterófago DE3, um derivado lambda que carrega um fragmento de DNA contendo o gene para T7 RNA polimerase sob controle do promotor lacUV5, que é induzido por isopropil-β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG). A adição de IPTG numa cultura de bactérias em crescimento induz a expressão da T7 RNA polimerase, que por sua vez reconhece o promotor T7 presente no vetor e transcreve o DNA inserido do plasmídeo de expressão (Studier e

Moffatt, 1986). As PLA₂s recombinantes sintetizadas por esta linhagem encontram-se sob a forma de corpos de inclusão insolúveis dentro do citoplasma da bactéria.

3.2.1. Preparação de células competentes de BL21 (DE3){pLysS}

A preparação das células competentes iniciou-se através do inóculo de bactérias *E.coli* da linhagem BL21(DE3){pLysS}, em meio HDM sólido (15 g.L⁻¹ triptona, 25 g.L⁻¹ extrato de levedura, pH 7,5) contendo 34 µg/mL de cloranfenicol e, posteriormente, foram incubadas a 37°C durante 12 horas. Em torno de 3-5 colônias foram inoculadas em 5 mL de HDM líquido e incubadas sob agitação a 180 rpm e 37°C durante aproximadamente 12 horas para fornecer um pré-inóculo. Todo o conteúdo deste pré-inóculo foi transferido para 500 mL de HDM líquido, ficando sob agitação a 180 rpm e 37°C até atingir a densidade óptica de 0,3 em 600 nm (cerca de 2 horas). A cultura foi incubada por 5 minutos no gelo. Após centrifugação a 4°C, 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 100 mL de tampão (CaCl₂ 60 mM, PIPES 10 mM e glicerol 15%). O homogeneizado foi novamente centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm, 4°C e o precipitado ressuspendido em 100 mL de tampão. O homogeneizado foi incubado em gelo por 30 minutos e a centrifugação repetida. Juntou-se o precipitado originado em cada um dos tubos e ressuspendeu-se em 12 mL de tampão final. As células competentes foram distribuídas em alíquotas de 50 µL e estocadas a -70°C.

3.2.2. Transformação de BL21 (DE3){pLysS} e indução de expressão

Após a preparação das células competentes, a transformação nesta linhagem segue similarmente ao protocolo de transformação em DH5 α , porém possui algumas pequenas alterações. Em cada tubo de 50 µL de células competentes foram adicionados 2 µL de DNA plasmidial recombinante (0,1µg/mL), 1,0 µL de 1M MgCl₂, 0,5 µL de 1M CaCl₂ e 46,5 µL de

água estéril. A mistura foi mantida no gelo por 20 minutos e em seguida a temperatura ambiente durante 10 minutos. A cada tubo foram adicionados 900 μ L de meio HDM contendo 10 mM de sulfato de magnésio e 20 mM de glicose para a regeneração celular, por 1 hora a 37°C sob a agitação de 180 rpm. Cerca de 50-100 μ L das células regeneradas foram plaqueados em HDM sólido contendo 100 μ g/mL de ampicilina, 34 μ g/mL de cloranfenicol e 10 mM de sulfato de magnésio. As células cresceram durante 12 horas a 37°C. Depois de 16 a 20 horas de crescimento, algumas colônias foram inoculadas em 400 mL de meio HDM contendo 100 μ g/mL de cloranfenicol e 4 mL de MgSO₄ (1M). A cultura foi incubada a 37°C sob agitação de 60 rpm, durante 12 horas, período no qual a fase logarítmica de crescimento é atingida. A expressão de hsPLA₂ gIIA foi induzida com 1mM de IPTG por 7 horas, a 37°C sob agitação de 200 rpm. A cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado (corpo de inclusão) armazenado a - 20°C.

3.3. Isolamento dos corpos de inclusão

Devido ao alto conteúdo de pontes dissulfeto, as proteínas de hsPLA₂ gIIA recombinante expressas são insolúveis no citoplasma celular, levando à formação desses agregados, cujo isolamento representou o primeiro passo da purificação das proteínas. O isolamento é necessário, pois as etapas de enovelamento subseqüentes são fortemente influenciadas pela presença de contaminantes, como lipídios, ácidos nucléicos, etc. A purificação dos corpos de inclusão da hsPLA₂ gIIA seguiu-se como descrito por (Othman *et al.*, 1996). As células derivadas de 400 mL de cultura foram ressuspendidas em Tris-Cl 50 mM pH 8.0, 50 mM de NaCl, 1 mM de EDTA e 0,5 mM de PMSF, num volume final de 30 mL. Triton X-100 e deoxicolato foram adicionados a 0,4% na concentração final e a mistura agitada por 20 minutos a 4°C. As células foram sonicadas em aparelho Sonic dismembrator

(Fisher scientific). Depois da centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos, o processo foi repetido aumentando a concentração final de TRITON X-100 e deoxicolato para 0,8%. O sedimento obtido depois da centrifugação foi lavado com o tampão contendo 1% de TRITON-X100 e a lavagem subseqüente realizada sem a adição de detergentes. Os corpos de inclusão isolados de 400 mL de cultura foram separados em 5 alíquotas e armazenados em - 20°C.

3.4. Modificação química de hsPLA2 gIIA e solubilização dos corpos de inclusão

Uma alíquota de corpos de inclusão foi incubada por 1 hora em 500 µL com uma solução contendo 4,8 M do agente desnaturante (tiocianato de guanidina) e NTSB (disódio 2nitro-5-(tiosulfo)-benzoato). O reagente NTSB foi obtido a partir da reação do composto DTNB com sulfito de sódio (Thannhauser *et al.*, 1984). O agente desnaturante promove a solubilização dos corpos de inclusão, uma vez que rompe a camada de solvatação existente entre a solução e a proteína, desestabilizando as interações hidrofóbicas e conseqüentemente expondo as pontes dissulfeto. Uma vez expostas, as pontes dissulfeto sofrem redução através dos grupos sulfito do NTSB. A adição de um grupo SO₃⁻ às cisteínas aumenta a solubilidade das mesmas. O esquema é ilustrado na figura 5.



FIGURA 5: Esquema ilustrativo da desnaturação e modificação química de proteínas sob a forma de corpos de inclusão.

Após esse período, a amostra foi aplicada em uma coluna de filtração em gel (2 x 5 cm) contendo resina P-6 (Bio-Gel[®]), 200-400 mesh, previamente equilibrada com 2 M de cloreto de guanidina, 20 mM de Tris e 2 mM de EDTA, pH 8,0 (Ward *et al.*, 2001). Esta etapa separa a proteína modificada, retirando o excesso de NTSB, como também reduz a concentração de GdnHCl de 4,8 M para 2 M. O pico de proteína eluído em cerca de 1,5 mL serviu como material inicial para o processo de enovelamento.

3.5. Enovelamento da hsPLA₂ gIIA

Para o processo de enovelamento das proteínas, fez-se necessário a incubação por 1 hora da proteína (~1,5 mL) em 15 µL de uma solução de 10 mM de cistina, 80 mM de cisteína, pH 7,5 diluída em Tris-HCl 25 mM. Posteriormente, esta solução foi diluída com Tris-HCl 25 mM para 2 mL e incubada por mais 1 hora. Em seguida, a amostra foi centrifufgada a 14000 rpm e o sobrenadante foi aplicado em coluna de filtração em gel (1,5 x 6 cm), contendo resina P-6 (Bio-Gel[®]), 200-400 mesh previamente equilibrada com tampão de enovelamento (25 mM Tris-HCl, 1 mM de cistina, 8 mM de cisteína e 0,3 M de hidrocloreto de guanidina, pH 8,0). O fluxo da amostra na coluna foi direcionado lentamente, durante 15 a 18 horas, com o intuito de evitar a formação de agregados de proteína e assim propiciar o enovelamento mais eficiente. Após esse período, as amostras foram eluídas em 5 mL do tampão (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA e 0,3 M de hidrocloreto de guanidina), aos quais foram adicionados 10 mL do mesmo tampão contendo 1 e 8 mM de cistina e cisteína, respectivamente. As amostras permaneceram sob agitação lenta por 2 dias em temperatura ambiente, e posteriormente as proteínas na conformação nativa foram purificadas.
3.6. Purificação de hsPLA₂ gIIA recombinante e mutantes

A hsPLA₂ gIIA e mutantes foram purificadas por cromatografia de troca catiônica. Utilizou-se uma coluna de dimensões 2x10cm previamente empacotada com SOURCE 15S (Amersham-pharmacia), uma resina fortemente aniônica devido à presença de grupos metilsulfonato. O mecanismo de separação por cromatografia de troca catiônica é baseado nos variados graus de afinidade que substâncias básicas diferentes apresentam pela matriz, devido a densidade e distribuição das cargas sobre a superfície molecular. A coluna foi equilibrada com 20 mM de Tris-Cl pH 7,5 e a proteína eluída em um gradiente linear entre 0 e 2,0 M de NaCl, com fluxo de 1 mL/min. A cromatografia foi realizada em CLAE (Shimadzu) previamente programado para um aumento de 0 a 100% do tampão salino em 20 minutos, sendo a absorbância do eluente monitorada em 280 nm. A pureza das amostras foi verificada por eletroforese utilizando-se gel de poliacrilamida 16%. Após a purificação, as proteínas hsPLA₂ gIIA recombinantes tipo selvagem e mutantes foram dialisadas em tampão 5 mM de Tris-HCl durante 24 horas e concentradas.

3.7. Dicroísmo circular

Dicroísmo circular (CD) é uma técnica para o estudo de moléculas quirais em solução. O CD é por definição a diferença em absorção, *A*, da luz polarizada circularmente (CPL) à direita e à esquerda:

$$CD = A_{\ell} - A_{r}$$

O sinal de CD é observado em comprimentos de onda onde a amostra absorve fótons, e o sinal pode ser positivo ou negativo dependendo da transição eletrônica que está sendo observada e a orientação intermolécula na amostra. Nas proteínas, a ligação peptídica é rígida e planar, e a rotação em volta do C α é limitada por impedimento estérico das cadeias laterais dos aminoácidos vizinhos. Isso faz com que certas conformações da cadeia principal sejam energicamente favorecidas e a repetição de arranjos das ligações peptídicas produz sinais bem definidos de CD, e a soma das contribuições de todos os elementos da estrutura secundária resulta num espectro que é característico de cada proteína (Gore, 1998).

O espectro de CD de proteínas é geralmente medido dentro das regiões entre 250 e 300 nm (denominada região UV-próxima) e em comprimentos de onda menores do que 250 nm (UV-distante). O espectro de CD na região próxima é dominado por sinais das cadeias laterais aromáticas, embora transições de ligações dissulfeto também contribuam para a intensidade de absorção total. A absorção na região do UV-distante é dominada por transições eletrônicas da cadeia polipeptídica da proteína, mas algumas cadeias laterais também contribuem nesta região, especialmente se o conteúdo de α -hélices da proteína é baixo. Uma vez que o espectro de CD da proteína nativa é a soma das porcentagens apropriadas de cada componente do espectro, uma das utilizações da técnica de CD no estudo de proteínas é a avaliação da conformação e estrutura protéica.

A avaliação da estrutura secundária da hsPLA₂ gIIA e das mutantes foi realizada em espectropolarímetro Jasco 810, em comprimentos de onda de 200 a 250 nm. Como cada proteína apresenta um padrão característico de sinal de CD, foram retirados espectros da proteína nativa e comparados aos espectros das proteínas recombinantes mutadas para avaliar se a mutação introduzida causou alteração na estrutura secundária da proteína. Para cada medida, utilizou-se 5 μ L de proteína de concentração desconhecida em 195 μ L de tampão Hepes 20 mM, pH 7,0. Foi utilizada cubeta de quartzo 1mm e o sinal de CD obtido foi resultado de uma média de três medidas de cada amostra. O sinal obtido da análise para apenas tampão foi subtraído de todas as amostras. O valor de elipticidade (θ) em 222 nm foi anotado e a concentração foi calculada de acordo com uma curva padrão de espectros de CD com concentrações crescentes de hsPLA₂ gIIA tipo selvagem (10 a 500 μ g/mL). A amplitude do sinal de elipticidade em 222 nm é diretamente proporcional à quantidade de proteína

utilizada. Os valores de elipticidade em 222 nm foram medidos em função da concentração de proteína para gerar uma curva padrão que foi utilizada para determinar a concentração de cada amostra de proteína recombinante.

3.8. Testes de ativação de macrófago através da produção de óxido nítrico

Os testes de ativação de linhagens de células de macrófagos foram realizados em colaboração com o laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Sabe-se que a fosfolipase humana está envolvida no processo de ativação de macrófagos, porém o mecanismo desta atividade ainda é desconhecido (Triggiani *et al.*, 2006). A ativação de macrófagos é uma componente chave da resposta imune do organismo, onde as células de macrófagos, quando ativadas, desencadeiam uma cascata de sinalização, a qual produz diversas substâncias, dentre elas, a produção de óxido nítrico (Baek *et al.*, 2000). Para avaliar o efeito da suramina na atividade de ativação de macrófagos da hsPLA₂ gIIA, duas linhagens foram utilizadas: células humanas (U937) e células peritoneais de camundongo Balb/c (RAW 264.7).

3.8.1. Manutenção de linhagens celulares

As células U937 foram expandidas em frascos de cultura celular em meio RPMI contendo 10% soro bovino fetal (SBF) e gentamicina, à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, conforme orientações do ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Após formada a monocamadas de células, as mesmas foram desgrudadas através de raspagem com suportes plásticos (rodos) apropriados.

Para o teste, a concentração de 5×10^5 células/mL foi incubada com concentrações crescentes da hsPLA₂ gIIA entre 100 e 1000 ng/mL por 24horas nas mesmas condições de

crescimento celular. Sabe-se que algumas substâncias, como as citocinas e produtos bacterianos, como LPS, promovem a ativação de células de macrófagos (Macmicking *et al.*, 1997; Nathan, 1992; Terenzi *et al.*, 1995). Dessa forma, a concentração de 500 ng/mL de LPS foi utilizada como controle positivo, por estimular a ativação da célula, e como controle negativo foi utilizado as células na presença apenas do meio de cultura.

Já as células RAW 264.7 foram expandidas em meio DEMEN contendo 10% de SBF nas mesmas condições, anteriormente citadas, até atingir a concentração de $2,5x10^5$ células/mL. Posteriormente, estas células foram incubadas por 24 horas, nas mesmas condições de crescimento, com concentrações crescentes de hsPLA₂ gIIA entre 100 e 10000 ng/mL. A concentração de 2 µg/mL de LPS foi utilizada como controle positivo.

O efeito de suramina na atividade de ativação de macrófagos da hsPLA₂ gIIA contra a linhagem RAW 264.7 foi avaliado adicionando concentrações crescentes de suramina entre 0 e 100 μ M na presença de 50 μ g/mL de hsPLA₂ gIIA. O controle negativo usando apenas suramina foi avaliado.

3.8.2. Quantificação de nitrito (NO₂-)

Para a dosagem de nitrito, 100 μ L do reagente de Greiss (solução estoque de 0,1% de NEED (naftiletilenodiamina) e sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ 5%) foram adicionados a 100 μ L de sobrenadante de cultura previamente descrito no item 3.8.1. Para análise quantitativa das amostras, uma curva padrão contendo nitrito em concentrações entre 3 a 200 μ M foi feita. de nitrito de sódio (Lane *et al.*, 1993). Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a densidade óptica (D.O.) foi obtida em leitor de microplacas em filtro de 540 nm (Metertech Inc., modelo 960). A quantidade de nitrito das amostras foi correlacionada aos valores de absorbância obtidos na curva padrão.

3.8.3. Atividade citotóxica

Para avaliar a atividade citotóxica da hsPLA₂ gIIA e da suramina contra as células de macrófagos foi utilizado o método colorimétrico de citotoxicidade pelo uso do 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT), onde este composto amarelo é clivado em um composto púrpuro insoluvél por dehidrogenases da mitocôndria da célula ativa (Mosmann, 1983). Células mortas não fazem essa reação. Assim, 5 x 10⁵ células RAW 264.7 foram incubadas com as diferentes concentrações da hsPLA₂ gIIA e de suramina por 24 horas em placas de cultivo celular de 96 poços, estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ à 37°C. Após o período de incubação, 10µL de MTT na concentração de 5mg/mL foram adicionados aos poços e mantidos por mais 3 horas nas mesmas condições em estufa umidificada. Após este período, foram acrescentados 50µL de solução de dodecil sulfato de sódio 20%/HC1 0,01 N. As placas de cultivo celular foram mantidas por uma noite à temperatura ambiente, sob abrigo da luz. A avaliação do índice de citotoxidade (IC50) foi medida em espectrofotômetro, utilizando filtro de interferência de 570nm.

3.9. Atividade bactericida

O efeito de suramina na atividade bactericida de hsPLA₂ gIIA tipo selvagem, contra linhagem *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), foi avaliada através de dois métodos: contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) e citometria de fluxo.

3.9.1. Contagem de Unidades formadoras de colônias (CFU) em placas de Petri

O teste realizado com a bactéria Gram-positiva, *Micrococcus luteus (M. lysodeikticus* - ATCC 9341), foi feito segundo o protocolo descrito por (Beers *et al.*, 2002). Em torno de 3-4 colônias de uma placa fresca cresceram por 12 horas a 37°C em 5 mL de meio LB líquido. Um mililitro dessa cultura foi inoculado em 50 mL de LB fresco e a cultura agitada a 180 rpm, 37°C até atingir densidade óptica de 0,45 em 600 nm. A cultura foi centrifugada a 6000

rpm por 10 minutos e o sedimento, ressuspendido em 10 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,4 contendo 1% de triptona, foi ajustado para $2x10^7$ CFU/mL para determinação da atividade bactericida. O efeito de suramina na atividade bactericida da proteína foi avaliado através da incubação de células e quantidades variáveis de suramina, entre 0 e 50 μ M, com uma concentração fixa de 5 μ g/mL da enzima humana, por 3 horas a 37°C em Na₂HPO₄ mais 1% de triptona. Em seguida, foi feita uma diluição serial das bactérias em LB sólido. O número das células viáveis foi analisado no dia seguinte, através da contagem de CFU por placa de cultura (Páramo *et al.*, 1998). A figura 6 representa o esquema ilustrativo do ensaio bactericida.



FIGURA 6: Esquema ilustrativo do ensaio bactericida. Considere tampão como controle negativo experimental (CFU = 100%).

3.9.2. Citometria de fluxo

Citometria de fluxo é uma técnica de medição das propriedades óticas das células (ou partículas em geral) individuais passando uma de cada vez por um feixe de laser, em um fluxo contínuo. A interação das partículas ou células com a luz é detectada com sensores para medir fluorescência e dispersão de luz. A figura 7 mostra uma representação esquemática de um aparelho de citômetro de fluxo. Esse aparelho faz com que as células em suspensão sejam obrigadas a fluir em fluxo laminar, de tal modo que se dispõem em fila única intersectando um feixe de iluminação com origem em uma ou mais fontes de iluminação, seja laser(s) e/ou lâmpada de vapor de mercúrio (Doležel, 1997). Quando uma célula (ou outra partícula microscópica) intersecta o feixe de luz, provoca um processo de dispersão fotónica e/ou de emissão de fluorescência, cuja intensidade depende das características da célula (Côrte-Real *et al.*, 2002). Os fótons dispersos na direção do feixe de laser podem ser detectados diretamente por um fotodiodo ou podem ser colhidos a 90º por lentes, espelhos dicróicos e filtros ópticos e focados em fotomultiplicadores: um para detectar dispersão lateral e dois para fluorescências.



FIGURA 7: Representação esquemática de um citômetro de fluxo.

Sondas de viabilidade celular podem detectar mudanças no estudo fisiológico ou no metabolismo, tanto de células eucarióticas quanto de procarióticas. Células sadias excluem tais sondas e não se tornam fluorescentes, entretanto células mortas ou que sofreram alterações na integridade da membrana citoplasmática permitem a entrada do marcador que se associa aos ácidos nucléicos, com um aumento conseqüente de fluorescência (Mortimer *et al.*, 2000). A combinação da técnica citômetro de fluxo com sondas fluorescentes tornar-se ideal para o desenvolvimento de testes de susceptibilidade bacteriana para antibióticos ou outros agentes bactericidas (Humphreys *et al.*, 1994; Mortimer *et al.*, 2000). Dessa maneira, a sonda de viabilidade celular sytox green foi utilizada para avaliar a integridade da membrana citoplasmática bacteriana.

Células de *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) na fase de crescimento exponencial foram centrifugadas a 6500 rpm, 4°C por 10 minutos e ressuspendidas em tampão 0,01 M de fosfato de sódio com 1% de triptona, pH 7.4 para densidade óptica de 0,47 em 660 nm. Alíquotas de 50 μ L de amostra contendo 2x10⁷ células/mL foram incubadas com uma mistura de 3 μ g/mL de hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e concentrações variáveis de suramina, por 3 horas a 37°C . Após esse período, as células foram diluídas (1:10) em tampão e 5 μ g/mL da sonda fluorescente sytox green adicionados. As amostras foram analisadas em FACsorting (Becton and Dickson, San Jose, CA-USA) utilizando o canal de fluorescência 2 (FL-2 para sytox green). As análises foram feitas usando os programas "Cell Quest" (Becton and Dickson) e "Win Midi", os quais permitem analisar todas as células adquiridas (10000 por amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (ou "gates") estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL).

3.10. Teste de atividade enzimática através de indicador de ácido graxo livre

ADIFAB (proteína de ligação de ácido graxo intestinal marcada com acrilodan) é um indicador fluorescente para a medida da concentração de ácidos graxos livres. Como já sugerido pelo nome, o indicador é um conjugado composto por uma sonda fluorescente sensível à polaridade do microambiente (acrilodan) e pela proteína de ligação de ácido graxo intestinal (I-FABP), uma proteína de baixa massa molecular (15 kDa) com alta afinidade para o ácido graxo (Richieri *et al.*, 1992; 1999). A detecção do ácido graxo pelo ADIFAB é baseada na mudança de posição do fluoróforo acrilodan em relação à bolsa de ligação apolar da proteína I-FABP quando ela torna-se ocupada pelo ácido graxo. A figura 8 ilustra um exemplo da mudança para comprimentos de onda maiores do espectro de ADIFAB causada pela titulação com ácido oléico e quanto maior a concentração de ácido graxo, menor a intensidade de fluorescência em 425 nm e maior em 505 nm, devido a um deslocamento do espectro para maiores comprimentos de onda. A mudança espectral do ADIFAB permite a determinação da concentração de ácidos graxos através da razão da intensidade de fluorescência do indicador ligado e desligado medido em 505 e 425 nm, respectivamente.

A solução estoque de ADIFAB foi preparada pela dissolução de uma unidade de 200 µg de ADIFAB (Sigma) em 1,0 mL de tampão 50 mM de Tris, 1 mM de EGTA, 0,05% de azida, pH 8.0 (solução estoque de 13 µM). Para o ensaio de volume final de 1 mL foram utilizados 15 µL de ADIFAB (estoque 200 µg/mL), 6 µL de vesículas unilamelares de DOPC:DOPG (estoque 5 mg/mL), 1 µL de CaCl₂ (estoque de 1mM), 0,1 µg/mL de proteína, concentrações crescentes de suramina entre 1 e 500 nM e tampão Hepes 20 mM, NaCl 20 mM para completar o volume. Os resultados foram obtidos em espectrofluorímetro Hitachi 4500 a 25°C, utilizando cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm sob agitação. O aparelho foi programado para medir a razão entre as intensidades de fluorescência em 505 e 425 nm com excitação de ADIFAB em 385 nm. A amostra contendo tampão, ADIFAB, vesículas lipídicas

e Ca²⁺ foi pré-incubada por 15 minutos e em seguida, a razão entre as intensidades de fluorescência em 505 e 425 nm foi monitorada por 2400 segundos. Após 800 segundos de ensaio, foram adicionados 0,1 μ g/mL da hsPLA₂ gIIA na ausência e na presença de concentrações crescente de suramina. A mistura de suramina e proteína foi incubada por 15 minutos antes do ensaio.



FIGURA 8: Titulação monitorada por fluorescência do ADIFAB com ácido oléico a 25°C. A concentração de indicador é 0,2 μM em 10 mM Tris-Cl, 0, 15 M NaCl, 1 mM de EGTA, pH 8.0. O espectro representante da maior concentração de ácido oléico titulada está representado por uma linha pontilhada.

A atividade específica enzimática é diretamente proporcional à quantidade de ácido graxo liberada pela hidrólise dos fosfolipídios DOPC:DOPG, na razão molar de 9:1, respectivamente. Portanto:

[ácido graxo] = $K_d \times 19.5 \times \{(R - R_0)/(11.5 - R) \ (Richieri et al., 1999)\}$

onde, K_d para os ácidos graxos liberados é de 0,28 (Richieri e Kleinfeld, 1995), Ro é a razão da intensidade de fluorescência sem ácido graxo, R é a razão quando o ADIFAB está ligado ao ácido graxo.

3.11. Atividade de liberação de calceína encapsulada em lipossomos

3.11.1. Preparação dos lipossomos

A calceína ($C_{30}H_{26}N_2O_{13}$, PM = 622,5) é um fluoróforo cujo comprimento de onda de excitação (λ ex= 490nm) e emissão (λ em = 520nm) são muito próximos. Assim, a emissão de uma molécula pode resultar na excitação de outra em um processo denominado "auto-supressão". Devido ao processo de auto-supressão, em concentrações altas (\geq 25mM) a luz fluorescente emitida por uma amostra é baixa, porém em soluções diluídas a intensidade da fluorescência aumenta. Portanto, os lipossomos carregados com uma alta concentração de calceína (50 mM) exibem uma intensidade de emissão de fluorescência baixa. Quando ocorre a danificação da membrana do lipossomo, a calceína encapsulada é liberada, diluindo-se na cubeta e em conseqüência a emissão da amostra aumenta cerca de 10 vezes.

Os lipossomos foram preparados pela técnica de evaporação de reverso de fase (Szoka e Papahadjopoulos, 1978), que permite a manipulação da composição fosfolipídica da bicamada artificial. Uma mistura de 50% de dioleoil fosfatidilcolina (DOPC – PM:786,1, Sigma) e 50% de dioleoil fosfatidilglicerol (DOPG – PM: 797, Sigma) foi dissolvida em éter (10 mg/mL) e, em seguida, submetida à secagem por evaporação. Posteriormente, colocou-se mais 2 mL de éter para dissolvê-los novamente e adicionou-se 1 mL de solução para encapsulação (tampão 25 mM de calceína, 20 mM Hepes, 150 mM NaCl pH7,0). Sonicou-se (Sonicator XL-Misonix) no gelo por 2 minutos na presença do tampão para formar uma emulsão de fase em reverso, na qual a solução aquosa foi encapsulada dentro de micelas reversas numa suspensão em éter. A fusão das micelas reversas foi induzida por uma

evaporação lenta do éter, resultando no "reverso" de fase (figura 9). Essa mistura é incubada em banho a 45° C por 30 minutos produzindo lipossomos unilamelares de diâmetro $1 \rightarrow 100$ µm.



FIGURA 9: Diagrama de formação de lipossomos pelo método de evaporação de fase reversa. Os lipídios são dissolvidos em solventes apropriados e ficam solúveis (1), após a fixação na superfície (2) eles formam as micelas em fase reversa (3). Com a sonicação, elas formam os lipossomos pela fusão entre as micelas (4, 5 e 6).

Os lipossomos foram filtrados com uma membrana de policarbonato com diâmetro de poro de 400 nm, produzindo uma população de lipossomo homogênea e de diâmetro definido, e, subseqüentemente, uma coluna de filtração em gel (Sephadex G-25, 1 x 10cm) foi usada para separar os lipossomos intactos contendo a sonda encapsulada da sonda livre. Como a filtração em gel dilui a solução de lipossomos, fez-se necessária à dosagem do fosfato das amostras com lipossomos. Esta dosagem serve para estimar a quantidade de fosfolipídios e dessa maneira, pode-se calcular a razão de toxina para fosfolipídio nos experimentos de liberação do marcador.

3.11.2 - Dosagem de fosfato dos fosfolipídios.

A dosagem de fosfato (Bartlett, 1959) é muito sensível e permite a avaliação na faixa de 0,1 a 10 μ g/mL de PO₄³⁻. Amostras de lipossomo (10, 20 e 30 μ L) foram fervidas a 100°C em ácido perclórico 70% por 5 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados 4,2 mL de água, 200 μ L de molibidato de amônio (Merck) 5% (Sigma) e 200 μ L de diaminofenol (Sigma) 1% em bissulfito de sódio 20% (Sigma). A solução foi agitada e deixada em banho de água fervente por 7 minutos. Leu-se a absorbância em 830nm em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico em espectrofotômetro Hitach U-2000. A curva padrão de fosfato foi feita com amostras contendo 0, 2, 4, 6, 8 e 10 μ g de Na₂HPO₄.

3.11.3. Liberação de calceína encapsulada em lipossomos

Os experimentos de liberação de calceína em lipossomos foram realizados em tampão 20 mM HEPES (Sigma) com 150 mM de NaCl (Merck) em pH 7,0 com uma mistura de quantidades variáveis de suramina, entre 0,5 e 5 µM e uma concentração fixa de 3 µg/mL de hsPLA₂ gIIA tipo selvagem. Essa quantidade de proteína e lipossomo corresponde à proporção de uma molécula de hsPLA₂ gIIA para 250 moléculas de lipídio. Além disso, as proteínas mutantes também foram avaliadas na ausência e na presença de 0,5 µM de suramina. Os experimentos foram realizados usando um espectrofluorímetro (Spectronic SLM 8100C), utilizando cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm, sob agitação, a 25°C. O comprimento de excitação foi em 480 nm e a emissão em 520 nm, sendo a abertura de excitação e emissão de 4 nm e a voltagem fotomultiplicadora de 600V. O detergente Triton X-100 foi adicionado (0,1%) no final do processo de liberação para se obter a intensidade de fluorescência máxima de liberação da calceína encapsulada. A figura 10 mostra um esquema ilustrativo do ensaio de liberação de calceína encapsulada em lipossomos.



FIGURA 10: Esquema ilustrativo do teste de liberação de calceína encapsulada em lipossomo. (A) Os comprimentos de onda de excitação e emissão da molécula de calceína são muito próximos, por isso ocorre auto-supressão; (B) Perfil da liberação de calceína provocada pela adição da proteína em 20 segundos e da liberação máxima de calceína provocada pela adição de Triton X-100 em 170 segundos em um total de 200 segundos de ensaio.

3.12. Calorimetria de titulação isotérmica (CTI)

Todas as medidas de titulação calorimétrica foram feitas em calorímetro Nano-ITC (modelo CSC 5300, Lindon, Utah, USA) a 25°C. Uma concentração de 6 μ M da hsPLA₂ gIIA foi colocada dentro da célula de amostra do calorímetro (v_{célula}= 1cm³) e titulada com 300 μ M de suramina, preparada em tampão 20mM de NaH₂PO₄, 150mM de NaCl, pH 7,2. A célula de

referência foi preparada com o mesmo tampão. Desse modo, a suramina foi adicionada em porções de 10 µL através da seringa, controlada pelo computador, com agitação de 200 rpm, para a mistura dos componentes da reação. Os experimentos de titulação consistiram de 25 injeções com intervalo apropriado de tempo de 300s entre as injeções. Os dados obtidos fornecem o fluxo de calor (µJ) em função do tempo (horas). O calor obtido em cada injeção foi calculado pela integração dos picos da curva do fluxo de calor usando o software (BindWorks) fornecido pelo instrumento. O controle experimental foi feito em condições idênticas às experimentais, através da titulação da suramina dentro da solução de tampão correspondente. Os efeitos do controle experimental foram subtraídos para corrigir efeitos de diluição, mistura e injeção.

3.13. Dinâmica molecular

O estudo de dinâmica molecular (DM) foi feito em colaboração com o Prof. Dr. Marcos Lourenzoni (Verdatis Biotecnologia S/A). As simulações de dinâmica molecular foram feitas usando o pacote GROMACS 3.3.1 (Lindahl E. et al., 2001) e o campo de força GROMOS-96 (43a2) (Lindahl E. et al., 2001). As cargas e topologia da suramina foram obtidas do servidor PRODRG (Universidade Dundee, RU. de http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg_beta), sendo topologia do que a GROMACS foi convertida em GROMOS-96(43a2). Os sistemas são compostos de águas explícitas, modelo SPC (Berendsen et al., 1981) e um monômero de hsPLA2 gIIA e uma molécula de suramina. Dois sistemas diferentes foram simulados e em cada sistema a suramina estava em posição diferente no complexo suramina/PLA₂. Uma das extremidades da suramina foi localizada dentro do sítio de ligação do substrato da hsPLA₂ gIIA (denominada SUR-1, mostrada em verde na figura 27B e 27C) e a outra extremidade (denominada SUR-2) está inicialmente dirigida para duas diferentes regiões eletricamente carregadas pelo efeito de grupos ionizados de arginina e lisina da PLA₂, localizados próximo a N- e C-terminal da proteína. A conformação na qual a SUR-2 faz contato com resíduos na região N-terminal foi denominada CONF-1 e a conformação na qual a SUR-2 está localizada próxima à região Cterminal foi denominada CONF-2. As montagens iniciais das coordenadas atômicas da hsPLA₂ gIIA complexada com a suramina foi feita pela superposição da hsPLA₂ gIIA com a estrutura cristalina do complexo entre a suramina e a PLA₂ do veneno de Bothrops asper (Murakami et al., 2005). Caixas cúbicas foram ajustadas para produzir as densidades experimentalmente corretas de 0.997 kg/L para moléculas de água. Cada sistema contém 16500 moléculas de água SPC. Todas as simulações de dinâmica molecular foram realizadas a volume e temperatura constantes, conjunto NVT. O algoritmo leapfrog (Hockney e Goel, 1974) foi utilizado para integrar as equações de movimento usando um intervalo de tempo de 2.0 fs. O tempo total de cálculo foi de 4.0 ns. Condições periódicas de contorno e convenção de imagem mínima foram aplicadas. A temperatura foi controlada usando o termostato de Berendsen (Berendsen et al., 1984) com constante de acoplamento temporal de 0.1 ps. Nove íons Cl⁻ foram inseridos nas posições mais favoráveis eletrostaticamente de forma a neutralizar localmente o sistema complexo de hsPLA₂ gIIA/suramina. As interações de longo alcance foram tratadas usando o método da soma de Ewald (PME) (Darden et al., 1993) e as contribuições das vizinhanças foram atualizadas a cada 5 fs. Um raio de corte de 1.4nm foi utilizado para computar as interações de curta e longa distância, van der Waals e eletrostáticas. Os comprimentos das ligações envolvendo átomos de hidrogênio nas moléculas da proteína foram controlados pelo algoritmo LINCS (Hess et al., 1997) e no caso das moléculas de água pelo algoritmo SETTLE (Miyamoto e Kollman, 1992). As velocidades iniciais foram obtidas da distribuição de Maxwell a 298 K. As simulações do complexo hsPLA₂ gIIA/suramina foram feitas em duas fases. Na primeira fase foi realizada uma simulação curta com posições atômicas congeladas de suramina+hsPLA₂ gIIA em ordem para efetuar a hidratação do complexo. Na segunda fase, as simulações de dinâmica molecular normal foram realizadas sem qualquer restrição nas posições atômicas e a trajetória foi coletada. As trajetórias atômicas foram analisadas e os desvios da raiz quadrática média (RMSD) da PLA₂ foram computados. Os potenciais intermoleculares de interação (PII), que é a soma de potenciais eletrostáticos e de Lennard-Jones, resultante da interação de átomos não ligados, foram monitorados na segunda fase. A PII foi computada entre a hsPLA₂ gIIA e a suramina com o objetivo de encontrar a correlação entre as medidas de PII e as afinidades realizadas por experimentos de fluorescência. As análises de dinâmica molecular, PII e RMSD foram feitas usando o pacote de software GROMACS 3.3.1 (Lindahl E. *et al.*, 2001).

3.14. Testes de caracterização dos efeitos de suramina contra as atividades das hsPLA₂s gIIA recombinantes

3.14.1. Teste de afinidade e mapeamento do sítio de ligação de suramina em hsPLA₂ gIIA medida através de fluorescência

Concentrações crescentes entre 0 e 100 μ M de suramina (Sigma), diluída em tampão 20 mM de NaH₂PO₄, 150 mM de NaCl, pH 7,2 foram acrescentadas a 3 μ M de hsPLA₂ gIIA recombinante e a afinidade de ligação foi monitorada através da medida de emissão da suramina no espectrofluorímetro Spectronic SLM 8100C a 25°C, utilizando cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm sob agitação. A suramina foi excitada em 350 nm e o espectro de emissão foi medida entre 375 e 500 nm (Fleck *et al.*, 2003).

3.14.2. Coeficiente de extinção molar de suramina

Nas medidas fluorimétricas, a suramina foi excitada no comprimento de onda de 350 nm. No entanto, devido à absorbância que o composto apresenta, há uma perda na intensidade de fluorescência emitida, como conseqüência do efeito de filtro interno. Para a correção desse efeito, fez-se necessário calcular o coeficiente de extinção molar da suramina (ϵ), para aplicar um fator de correção para a análise correta das medidas de intensidade de fluorescência. Dessa maneira, uma curva padrão da absorbância de suramina em função de sua concentração foi feita (figura 11). Utilizando uma solução padrão de 100 μ M de suramina, diferentes concentrações entre 0 e 70 μ M foram diluídas em tampão 20 mM de NaH₂PO₄, 150 mM de NaCl, pH 7.2 e as absorbâncias foram medidas em um espectrofotômetro (Spectronic Genesys 2), anteriormente zerado com o ar, utilizando cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. O coeficiente de extinção molar de suramina, calculado através da tangente da reta, foi de 7060 cm⁻¹M⁻¹.



FIGURA 11: Curva padrão da absorbância de suramina. O comprimento de onda utilizado foi de 350 nm e o coeficiente de extinção molar calculado foi de 7060 cm⁻¹M⁻¹.

4. RESULTADOS

4.1. Expressão, enovelamento e purificação da hsPLA₂ gIIA e mutantes

4.1.1. Purificação das proteínas recombinantes mutantes da hsPLA2 gIIA

Após o enovelamento das proteínas recombinantes expressadas em *E.coli*, as mesmas foram purificadas em HPLC, utilizando resina de troca catiônica SOURCE 15S. A figura 12 mostra o resultado da purificação por troca catiônica das proteínas recombinantes tipo selvagem e mutantes D49K, Δ K57/R58, H48Q, K115A, K116A, K38A, K53A, K54A e R7A de hsPLA₂ gIIA. O fração protéica padrão (2) representa a hsPLA₂ gIIA recombinante tipo selvagem eluída em torno de 12 a 14 minutos com cerca de 600 mM de NaCl e a fração (1) corresponde às formas não nativas da hsPLA₂ gIIA. Este resultado foi confirmado pela avaliação da estrutura secundária das duas frações, através da utilização da técnica de dicroísmo circular.



FIGURA 12: Cromatograma da purificação da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e mutantes em coluna de troca catiônica Source 15S. O mesmo perfil de eluição é apresentado tanto para hsPLA₂ gIIA tipo selvagem quanto para as proteínas recombinantes mutadas. A fração 1 corresponde às formas mal redobradas da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e mutantes durante o processo de enovelamento e a fração 2 corresponde à forma nativa das proteínas eluídas em torno de 12 a 14 minutos.

As proteínas recombinantes mutadas de hsPLA₂ gIIA apresentaram uma leve alteração no tempo de eluição em relação ao da proteína tipo selvagem, devido às mutações sítiodirigidas que substituem aminoácidos positivos por alanina. As demais proteínas mutadas K15A, K57A, R58A e K123A também apresentaram o mesmo perfil de eluição da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem (dados não mostrados). A ausência de picos adicionais mostrou que os corpos de inclusão extraídos das células de *E. coli* foram bem purificados, eliminando a presença de proteínas contaminantes de *E.coli*. Os níveis de hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e mutadas obtidas após purificação variaram de 5,0 a 15,0 mg/L de cultura.

4.1.2. Dicroísmo circular da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e mutantes

Para excluir a possibilidade de grandes perturbações estruturais causadas pelas mutações pontuais na proteína, mediu-se o espectro de CD das proteínas mutantes da hsPLA₂ gIIA na região UV-distante (200-250nm) para avaliar a estrutura secundária. Proteínas ricas em α -hélices apresentam espectro de CD característico com valores mínimos em 208 e 222 nm.

A figura 13 mostra o espectro de CD da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e das mutantes R7A, K15A, G30S, K38A, H48Q, D49K, K53A, R54A, K57A, R58A, Δ K57/R58, K115A, K116A e K123A. Todas as proteínas mutadas apresentadas na figura mostraram o espectro de CD semelhante ao da proteína tipo selvagem, que apresenta dois mínimos em 208 e 222 nm, característico de proteínas ricas em α -hélice.



FIGURA 13: Espectro de dicroísmo circular na região UV-distante de hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e proteínas mutantes. As mutações sítio-dirigidas apresentadas não perturbaram a estrutura secundária das proteínas recombinantes.

Após a caracterização bioquímica, as proteínas tipo selvagem e mutantes foram utilizadas em ensaios biológicos e biofísicos para mapear o sítio de ligação da suramina com a hsPLA₂ gIIA.

4.2. Teste de atividade enzimática através de indicador de ácido graxo livre

Um teste de atividade hidrolítica, realizado através da técnica do ADIFAB, um indicador de ácido graxo livre, foi feito tanto para a hsPLA₂ gIIA tipo selvagem quanto para as mutantes G30S, H48Q e D49K. Essas três mutantes do sítio ativo da hsPLA₂ gIIA foram utilizadas para avaliar se a propriedade de hidrolisar fosfolipídios de membranas, era na sua integridade, responsável pelas atividades observadas contra membranas biológicas e artificiais. A figura 14 mostra a razão de intensidade de fluorescência por tempo após adição das proteínas. Através da metodologia utilizada, com substrato de mesma composição

fosfolipídica dos experimentos de liberação de calceína, porém com proporção molar de 9 DOPC: 1DOPG, tanto a hsPLA₂ gIIA tipo selvagem quanto as proteínas recombinantes mutadas apresentaram atividade hidrolítica, através do aumento da razão da intensidade de fluorescência (I_{505}/I_{425} nm) observada.



FIGURA 14: Hidrólise fosfolipídica da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e proteínas mutadas no sítio ativo na presença de Ca²⁺. Razão da intensidade de fluorescência (I) em 505 e 425 nm após a adição de 0,1 μ g/mL da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e 30 μ g/mL das mutantes G30S, H48Q e D49K. Para o controle experimental foi adicionado 0,1 μ g/mL da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem na presença de 1mM de EGTA. Gráficos representativos de um total de 3 experimentos. A adição das proteínas foi feita após 10 minutos.

A partir dos dados obtidos anteriormente, as atividades hidrolíticas para as proteínas mutantes também foram calculadas (figura 15). As proteínas mutantes G30S, H48Q e D49K apresentaram, respectivamente, atividades específicas de 0,125 μ M.min⁻¹.mg⁻¹ (0,046% da atividade da enzima tipo selvagem); 0,118 μ M.min⁻¹.mg⁻¹ (0,043% da atividade da enzima tipo selvagem) e 0,049 μ M.min⁻¹.mg⁻¹ (0,018% da atividade da enzima tipo selvagem). Assim como observado para a proteína tipo selvagem (ver controle da figura 14), as proteínas

mutantes também não apresentaram atividade hidrolítica na presença de EGTA, um quelante de Ca²⁺ (dados não mostrados). Dessa maneira, o resultado mostrou que as mutações pontuais geradas no sítio ativo da proteína reduziram significativamente a atividade de hidrólise da mesma.



FIGURA 15: Atividade hidrolítica da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e proteínas mutadas no sítio ativo na presença de Ca²⁺. A proteína tipo selvagem apresentou uma atividade específica de 271 μ M.min⁻¹.mg⁻¹, enquanto as mutantes G30S, H48Q e D49K apresentaram, respectivamente, atividades específicas de 0,125 μ M.min⁻¹.mg⁻¹; 0,118 μ M.min⁻¹.mg⁻¹ e 0,049 μ M.min⁻¹.mg⁻¹. Gráficos representativos de um total de 3 experimentos.

4.3. Caracterização do efeito da suramina nas atividades biológicas da hsPLA₂ gIIA

4.3.1. Atividade de ativação de macrófago através da produção de óxido nítrico

Os testes de ativação em linhagens de células de macrófagos baseiam-se na avaliação da produção de NO, um método viável por ser barato e de fácil manipulação. Dessa maneira, a atividade de ativação de macrófago da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem foi avaliada contra a linhagem de células humanas U937. A figura 16 mostrou ausência de ativação das células, uma vez que a concentração de nitrito, produzida pelas células incubadas com diferentes concentrações da proteína, manteve-se no nível basal do controle negativo (células sem

estímulo). Além disso, o controle positivo, feito com 500 ng/mL de LPS, não estimulou a ativação celular conforme esperado. Dessa maneira, decidimos não continuar os estudos com essa linhagem.



FIGURA 16: Avaliação da ativação de células de macrófagos U937 pela ação da hsPLA₂ gIIA através da produção de nitrito. Concentrações crescentes de hsPLA₂ gIIA tipo selvagem entre 0,1 e 1 μ g/mL foram incubadas com 5x10⁵ células/mL. O controle positivo (C+) corresponde 500 ng/mL de LPS e o controle negativo corresponde às células sem estímulo.

O teste de ativação dos macrófagos de linhagem RAW 264.7 também foi avaliado e o resultado mostrou que a concentração de nitrito aumenta gradativamente com o aumento da concentração da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem, ou seja, o efeito de ativação de macrófagos é dependente da concentração protéica e que nessas concentrações não há citotoxicidade à célula (dados não mostrados). Dessa forma, pôde-se concluir que a hsPLA₂ gIIA promove a ativação dessa linhagem de macrófagos, uma vez que a produção de nitrito para todas as concentrações utilizadas foi significativamente maior do que o controle negativo ($p \le 0,05$). A figura 17 mostra o efeito de ativação de macrófagos RAW 264.7 pela ação de 50µg/mL da

hsPLA₂ gIIA. Esta concentração foi escolhida, pois além de não apresentar citotoxicidade para as células, confere uma ativação de aproximadamente 50 % de efeito. Os testes foram feitos na presença de polimixina, um composto policatiônico que neutraliza o efeito do LPS (Delehanty *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2008), para eliminar qualquer traço contaminante de LPS proveniente da preparação da proteína recombinante expressada em *E.coli*.



FIGURA 17: Avaliação da ativação de células de macrófagos RAW 264.7 pela ação da hsPLA₂ gIIA através da produção de nitrito. Concentração fixa de 50 μ g/mL hsPLA₂ gIIA tipo selvagem foi incubada com 2x10⁵ células/mL. O controle negativo corresponde às células apenas; o controle positivo (C+) corresponde a 2 μ g/mL de LPS e o controle (PM) corresponde a 2 μ g/mL de LPS com adição de 30 μ g/mL de polimixina (PM), um inibidor de LPS.

Para caracterizar se a atividade de ativação de macrófagos da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem é ou não dependente de catálise, um teste foi feito com as proteínas mutantes do sítio ativo. A figura 18 mostra a concentração de nitrito produzida pelas células RAW 264.7 quando incubadas com as proteínas tipo selvagem e mutantes G30S, H48Q e D49K. O resultado mostrou que as proteínas mutantes reduziram drasticamente a atividade de ativação

em relação a tipo selvagem, demonstrando que a atividade de ativação de macrófagos RAW 264.7 da hsPLA₂ gIIA é dependente da atividade catalítica.



FIGURA 18: Avaliação da ativação de células de macrófagos RAW 264.7 pela ação da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e mutantes através da produção de nitrito. A concentração de $2x10^5$ células/mL foi incubada com 50 µg/mL da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e das mutantes G30S, H48Q e D49K. O controle negativo (C-) corresponde às células sem estímulo; o controle positivo corresponde a 2 µg/mL de LPS e o controle PM corresponde a 2 µg/mL de LPS com adição de 30 µg/mL de polimixina, um inibidor de LPS.

Posteriormente, o efeito da suramina na atividade de ativação de macrófagos da $hsPLA_2$ gIIA tipo selvagem foi avaliado. A figura 19 mostra a concentração de nitrito produzida pelas células quando incubadas com 50 µg/mL da proteína tipo selvagem na presença de concentrações crescentes de suramina. O resultado demonstra que a suramina inibe essa atividade de maneira dose- dependente, reduzindo em 68% da atividade da proteína tipo selvagem com 100 µM de suramina.



FIGURA 19: Efeito da suramina na atividade de ativação de macrófagos RAW 264.7 da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem. A mistura de 50 μ g/mL de hsPLA₂ gIIA com concentrações crescentes de suramina foram incubadas com 2x10⁵ células/mL.

4.3.2. Atividade bactericida

4.3.2.1. Contagem de Unidades formadoras de colônias (CFU) em placas de Petri

O efeito de suramina na atividade bactericida de hsPLA₂ gIIA tipo selvagem foi avaliado contra a linhagem *Micrococcus luteus* (ATCC 9341). Concentrações crescentes entre 0 e 50 μ M de suramina foram incubadas com 2x10⁷células/mL por 3 horas a 37°C na presença de uma concentração fixa de 5 μ g/mL da proteína. A figura 20 mostra o número de CFU/mL (unidades formadoras de colônias) em função da concentração de suramina. O resultado mostrou ausência de efeito de redução de CFU para suramina sozinha (controle negativo). A hsPLA₂ gIIA, na ausência de suramina, apresentou uma diminuição de 85 % do número de CFU. Entretanto, na presença de diferentes concentrações de suramina, a atividade bactericida da proteína tipo selvagem foi de 90 % de redução de CFU, demonstrando que a interação de suramina com a proteína tipo selvagem não altera significativamente sua atividade bactericida contra *M. luteus*.



FIGURA 20: Efeito de suramina na atividade bactericida da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem. Efeito sobre $2x10^7$ células/mL de *M.luteus*. Os controles negativo e positivo correspondem, respectivamente, a apenas células e suramina sozinha (50 µM). A concentração da proteína foi de 5 µg/mL. O gráfico é representativo de um total de 3 experimentos.

4.3.2.2. Citometria de fluxo

O efeito de suramina na atividade bactericida da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem contra *M.luteus* também foi avaliado através da técnica de citometria de fluxo. Alíquotas de 50 μ L contendo 2x10⁷ células/mL foram incubadas com uma mistura de uma concentração fixa de 5 μ g/mL da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e concentrações variáveis de suramina, por 3 horas a 37°C. Após esse período, as células foram diluídas (1:10) em tampão e 5 μ g/mL da sonda Sytox Green adicionados. Os histogramas da figura 21 mostram a distribuição de intensidade de fluorescência em: (A) células bacterianas (controle negativo); (B) células fervidas para permeabilizar as membranas da bactéria, permitindo a incorporação máxima da sonda (controle positivo experimental); (C) células incubadas com 10 μ M de suramina; (D) das células apenas na presença de 5 μ g/mL de hsPLA₂ gIIA, (E) células na presença de suramina

(10 μM) e hsPLA₂ gIIA (5 μg/mL) e (F) concentrações crescentes de suramina na presença da hsPLA₂ gIIA. Quando a sonda entra, ela se associa com os ácidos nucléicos, ocorre um aumento da eficiência quântica da sonda e conseqüente aumento da fluorescência observada. O controle positivo (B) mostrou que todas as células bacterianas foram permeabilizadas quando aquecidas. As células bacterianas que foram incubadas com suramina (C) revelaram o mesmo perfil do controle negativo (A), ou seja, baixa intensidade de fluorescência da sonda, evidenciando que suramina sozinha não apresenta efeito bactericida. Comparando os histogramas D e E pode-se ver claramente que a suramina não inibe a atividade bactericida da hsPLA₂ gIIA até a concentração máxima testada (ver gráfico F).



FIGURA 21: Histogramas do efeito de suramina na atividade bactericida da hsPLA₂ gIIA contra *M.luteus* fornecidos através da citometria de fluxo. Em (A) apenas bactérias (controle negativo); (B) bactérias aquecidas (controle positivo); (C) células na presença de suramina (10 μ M); (D) células na presença de 5 μ g/mL de hsPLA₂ gIIA, (E) células na presença de suramina (10 μ M) e hsPLA₂ gIIA (5 μ g/mL) e (F) porcentagem de CFU em função da concentração de suramina na presença de 5 μ g/mL de hsPLA₂ gIIA.

4.4. Caracterização do efeito da suramina nas atividades da hsPLA₂ gIIA contra membranas artificiais

4.4.1. Atividade de danificação de membranas independente de Ca²⁺

A liberação de marcadores fluorescentes encapsulados dentro de lipossomos é uma técnica utilizada para o estudo dos efeitos da interação de PLA₂s com membranas. Nestes experimentos, a perda da integridade da membrana lipossomal resulta na diluição do fluoróforo, com conseqüente aumento do sinal de fluorescência (De Oliveira *et al.*, 2001; Rufini *et al.*, 1992). A liberação total do fluoróforo encapsulado ocorre após a adição de 0,1% do detergente TRITON X-100 em 170 segundos de ensaio e os dados são apresentados como porcentagem deste valor máximo.

Após a caracterização dos testes de liberação com diferentes misturas lipídicas (dados não mostrados), a mistura de DOPC:DOPG foi escolhida para caracterizar o efeito de suramina contra a atividade de danificação da hsPLA₂ gIIA, uma vez que apresenta maior estabilidade e tem sido ostensivamente utilizada na literatura para o entendimento do mecanismo de ação da proteína (Baker *et al.*, 1998; Beers *et al.*, 2003). Dessa forma, um estudo com essa mistura na razão molar de 1:1 foi feito e os resultados mostraram que a atividade de danificação de membranas independente do cofator Ca²⁺ foi dependente da concentração da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem (figura 22). A faixa de concentração de proteína utilizada foi de 2 a 8 μ g/mL, onde 2 μ g/mL apresentou uma atividade de liberação de calceína de aproximadamente 24%. Esse resultado sugere que a atividade de danificação de membranas artificiais da hsPLA₂ gIIA é independente da hidrólise.



FIGURA 22: Porcentagem de liberação de calceína induzida pela hsPLA₂ gIIA. Adições de concentrações crescentes entre 2 e 8 μ g/mL da proteína hsPLA₂ gIIA tipo selvagem em 15 segundos, levaram à liberação de calceína do interior dos lipossomos. Após a adição de 0.1% de TRITON X-100, em torno de 170 segundos, ocorreu 100% de liberação.

Entretanto, para melhor avaliação do efeito da suramina sobre a atividade de liberação de calceína da hsPLA₂ gIIA contra essa mistura lipídica, a proporção molecular de proteína:lipídio foi alterada de 1:400 para 1:200, respectivamente. Esta mudança fez com que a proteína apresentasse uma maior atividade de danificação de membranas, pois com 4 μ g/mL mostrou uma liberação de calceína de aproximadamente 40% (figura 23). Dessa maneira, concentrações crescentes de suramina entre 0,25 e 12 μ M foram adicionadas à proteína, na concentração fixa, anteriormente relatada, e esse resultado revelou que a suramina reduziu a atividade da proteína gradativamente. Esse efeito de inibição refletiu um comportamento com dois patamares sugerindo, inicialmente, a existência de dois sítios ou mais de ligação da suramina na proteína.



FIGURA 23: Efeito de suramina na liberação de calceína induzida por hsPLA₂ gIIA em lipossomos compostos de 1:1 DOPC:DOPG. Porcentagem da liberação de calceína encapsulada após 150 segundos da adição da proteína tipo selvagem, na presença de concentrações crescentes de suramina entre 0,25 e 12 μM. A hsPLA₂ gIIA tipo selvagem apresentou 42% de liberação (na ausência de suramina).O efeito de liberação da proteína é menor quanto maior a concentração de suramina. A suramina sozinha não causou liberação significativa de calceína (dado não mostrado). Com a adição de 0.1% de TRITON X-100, em torno de 170 segundos, ocorreu 100% de liberação.

Com o intuito de mapear o sítio de ligação da suramina responsável pela inibição da atividade de danificação da hsPLA₂ gIIA e, posteriormente, correlacionar com os dados de afinidade, o efeito da suramina na atividade de liberação de calceína das proteínas mutantes foi avaliado (figura 24). Para o teste, utilizou-se a concentração fixa de 4 μ g/mL de hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e proteínas mutadas na ausência e na presença de 0,75 μ M de suramina, sendo que esta concentração foi escolhida, pois promove a inibição de aproximadamente 50% da atividade da proteína tipo selvagem.



FIGURA 24: Efeito da suramina na liberação de calceína induzida por hsPLA₂ gIIA e mutantes em lipossomos compostos de 1:1 DOPC: DOPG. Porcentagem de liberação de calceína encapsulada após 150 segundos de adição das amostras. As barras preenchidas correspondem a 4 μ g/mL das proteínas hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e mutantes na ausência de suramina. As barras hachuradas correspondem a 4 μ g/mL das respectivas proteínas na presença de 0,75 μ M de suramina.

Para melhor visualização do efeito da suramina na atividade de liberação de calceína da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e mutantes em lipossomos com 1:1 DOPC – DOPG, um gráfico da porcentagem de redução da liberação de calceína foi feito (figura 25). O resultado mostrou que a suramina inibiu de forma reduzida a atividade de liberação das proteínas mutantes R7A, K15A, R54A, R58A e K123A em relação à proteína tipo selvagem. Já para as mutantes H48Q, D49K e K116A a suramina realçou este efeito.



FIGURA 25: Porcentagem de inibição da atividade de liberação de calceína da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e mutantes, em lipossomos compostos de 1:1 DOPC:DOPG, pela ação da suramina. Porcentagem de inibição da liberação de calceína encapsulada após 150 segundos da adição das amostras. Foram utilizadas 4µg/mL de cada proteína na presença de 0,75 µM suramina. A atividade de liberação de calceína da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem foi reduzida em 50%.

4.4.2. Atividade hidrolítica da hsPLA₂ gIIA

A figura 26 mostra o efeito da suramina na atividade de hidrólise da proteína tipo selvagem, avaliado nas mesmas condições descritas no item 4.2. A hsPLA₂ gIIA apresentou uma atividade específica de 271 µM.min⁻¹.mg⁻¹, na ausência de suramina, enquanto que na presença de concentrações crescentes de suramina apresentou uma atividade específica reduzida, chegando a 35µM.min⁻¹.mg⁻¹ com 100 nM de suramina (13% da atividade da enzima tipo selvagem). Esse resultado mostra que a suramina inibe a atividade hidrolítica da enzima, sugerindo a existência de um possível sítio de ligação da suramina.



FIGURA 26: Efeito da suramina na atividade hidrolítica da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem. A atividade específica da hsPLA₂ gIIA foi de 271 μmol.mim⁻¹.mg⁻¹. Na presença de concentrações crescentes de suramina, a atividade da proteína foi reduzida, chegando a 35 μmol.mim⁻¹.mg⁻¹ com 100 nM de suramina.

4.5. Caracterização estrutural da interação da suramina com a hsPLA₂ gIIA recombinante

4.5.1. Dinâmica molecular

Estudos de dinâmica molecular foram utilizados para auxiliar na caracterização estrutural da interação do complexo suramina/hsPLA₂ gIIA. A localização inicial da suramina na superfície da hsPLA₂ gIIA identificou duas configurações alternativas (denominadas CONF-1 e CONF-2 – ver materiais e métodos). A molécula de suramina foi dividida em duas regiões SUR-1 e SUR-2. Em ambas as configurações, a região SUR-1 da suramina encontrase localizada na superfície que forma a região do sitio ativo/ligação do substrato. A figura 27 mostra, em CONF-1, a região SUR-2 da suramina que está em contato com o resíduo K15 da região N-terminal da proteína (Figura 27 B), e em CONF-2, a região SUR-2 da suramina está orientada para o resíduo K116 localizado na região C-terminal (Figura 27 C).



FIGURA 27: (A) Estrutura química da suramina mostrando a divisão da molécula (regiões denominadas de SUR-1 e SUR-2) para análise dos dados de simulação molecular. (B) e (C) Representação em superfície sólida do complexo hsPLA₂ gIIA/suramina com vista para o sítio de reconhecimento interfacial (SRI) da proteína, mostrando as regiões SUR-1 (verde) e SUR-2 (vermelho) da suramina. As duas configurações CONF-1 (B) e CONF-2 (C) da suramina são mostradas, na quais a SUR-2 faz contatos com os aminoácidos K15 e K116 (em azul) nas regiões N- e C-terminal da proteína (indicada como N e C, respectivamente).
Simulações de dinâmica molecular também foram utilizadas para avaliar em mais detalhes as regiões da proteína que podem estar envolvidas na formação do complexo suramina/hsPLA₂ gIIA. A energia potencial intermolecular (PE) tem sido utilizada como parâmetro para avaliar os sítios de ligação no complexo. A energia potencial total é a soma das interações entre a hsPLA₂ gIIA e as regiões SUR-1 e SUR-2 da suramina. Estes potenciais de energia foram designados de PE_{S1} (PE entre a hsPLA₂ gIIA e SUR-1), PE_{S2} (PE entre a hsPLA₂ gIIA e SUR-2) and PE_S (a PE total entre hsPLA₂ gIIA e a suramina, igual a soma de PE_{S1} e PE_{S2}). As trajetórias destas energias potenciais estão representadas na figura 28, a qual mostra que os perfis da energia potencial de PE_{S1} (figura 28, painel superior) são similares para as CONF-1 e CONF-2, com altas energias de atração variando entre 10.0 e 34.0 kJ.mol⁻¹. Em contraste, as trajetórias de PE_{S2} da região SUR-2 da suramina na conformações CONF-1 e CONF-2 apresentam diferentes perfis (figura 28, painel do meio).

Embora a energia média mais baixa fosse alcançada durante a simulação da conformação CONF-2, no fim do curso do tempo as energias de ambas as conformações eram aproximadamente iguais. A média tomada sobre a simulação inteira sugere que a CONF-2 é favorecida por uma diferença da energia potencial de -15.0 kJ.mol⁻¹. Além disso, os desvios padrões das energias potenciais são reduzidos na simulação CONF-2 em comparação com a CONF-1, a qual é característica de uma conformação mais estável. As diferenças observadas na energia potencial total (PE_s) durante a simulação (figura 28, painel inferior) refletem as diferentes interações da região SUR-2 da suramina com a proteína nas conformações CONF-1 e CONF-2.

Portanto, os estudos de simulação identificaram 3 regiões que podem estar envolvidas na interação do complexo hsPLA₂ gIIA/suramina.



FIGURA 28: Trajetórias da energia potencial (PE) para o complexo hsPLA₂ gIIA/suramina. As médias e desvios padrões (sd) para os valores de PE de ambas configurações CONF-1 e CONF-2 são mostradas para as regiões SUR-1 e SUR-2 da suramina (painéis superior e do meio, PE_{S2} e PE_{S1} , respectivamente), e a molécula completa de suramina (painel inferior - PE_S).

4.5.2. Calorimetria de titulação isotérmica (CTI)

A predição dos estudos de dinâmica molecular foi avaliada por calorimetria de titulação isotérmica (CTI) e os resultados são apresentados na figura 29. A linha sólida da curva de titulação calorimétrica foi melhor descrita pelo modelo independente de ligação que identificou 2.7 sítios de ligação da suramina por molécula de proteína, o que é consistente com o número de sítios preditos pelos estudos de simulação de dinâmica molecular. A entalpia de interação da suramina é endotérmica com o valor de 119,8 kJ.mol⁻¹ e a afinidade de ligação aparente da suramina pela hsPLA₂GIIA foi de 4,2 x 10⁻⁶.



FIGURA 29: Curva calorimétrica da interação entre a suramina com a hsPLA₂ gIIA obtida pela técnica de calorimetria de titulação isotérmica (CTI). A linha sólida representa a melhor apresentação dos dados experimentais usando o modelo independente de ligação (ver materiais e métodos para mais detalhes).

Em suma, os resultados experimentais de CTI sugerem que a hsPLA₂ gIIA apresenta 3 sítios de ligação da suramina e a análise das características eletrostáticas das duas moléculas envolvidas na formação do complexo, avaliadas pela técnica de DM, mostrou que é possível predizer 2 configurações da ligação da suramina baseada nas interações dos grupos carregados. Estes resultados predizem que os 3 sítios de ligação da suramina na hsPLA₂ gIIA, observados nos experimentos de CTI, são localizados em 1) região do sítio ativo/ligação do substrato, 2) na região ao redor do resíduo K15 da região N-terminal e 3) na região ao redor do resíduo K116 da região C-terminal da proteína.

A partir desses resultados, a caracterização estrutural da interação do complexo suramina/hsPLA₂ gIIA foi avaliada pela técnica de fluorescência utilizando mutantes sítiosdirigidos da hsPLA₂ gIIA para mapear os sítios de ligação da suramina.

4.5.3. Teste de afinidade e mapeamento do sítio de ligação de suramina em hsPLA₂ gIIA medida através de fluorescência

Ensaios da afinidade de suramina com a hsPLA₂ gIIA tipo selvagem foram feitos através da medida de fluorescência de suramina. Concentrações variáveis de suramina foram acrescentadas a uma concentração fixa de 3 μ M da proteína. A figura 30 mostra que o aumento da intensidade de fluorescência de suramina, quando a mesma interage com a hsPLA₂ gIIA (B), é dependente da concentração de suramina.



FIGURA 30: Intensidade de fluorescência da interação da suramina com hsPLA₂ gIIA pela variação do comprimento de onda (λ) de emissão da suramina. Concentrações de suramina entre 0 e 5 μ M foram incubadas com 3 μ M da proteína.

A intensidade de fluorescência de suramina foi medida em comprimento de onda fixo de 440 nm (figura 31), para avaliar o comportamento do perfil de afinidade da suramina por hsPLA₂ gIIA tipo selvagem. Esse resultado mostrou que a suramina interage com a proteína tipo selvagem na faixa de concentração em micromolar, além disso, essa interação revelou um perfil com comportamento sigmoidal. A linha sólida nos dados representa uma sigmoidal por "Least Squares Fitting", que fornece uma estimativa da constante de afinidade da suramina por hsPLA₂ gIIA tipo selvagem de 6,309 μ M. Este resultado corrobora com a afinidade observada pelos dados de CTI.



FIGURA 31: Afinidade da suramina com $hsPLA_2$ gIIA pela concentração de suramina. Comportamento sigmoidal da ligação de 3 μ M de proteína com concentrações variáveis de 0 a 100 μ M de suramina.

Para mapear os sítios de ligação da suramina em hsPLA₂ gIIA, através da medida de fluorescência de suramina, diferentes concentrações de suramina entre 0 e 50 μ M foram adicionadas à concentração fixa de 3 μ M de cada proteína mutante. A figura 32 mostra que todas as mutantes apresentaram o mesmo perfil de comportamento sigmoidal em relação à tipo selvagem.



FIGURA 32: Intensidade de fluorescência da afinidade da suramina com hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e mutantes pela concentração de suramina. Comportamento sigmoidal da ligação de 3 μ M de cada proteína com concentrações variáveis de 0 a 50 μ M de suramina.

A partir dos dados da figura 32, a tabela I foi feita para mostrar as estimativas da constante de afinidade da suramina pelas proteínas mutantes da hsPLA₂ gIIA. As proteínas mutantes que demonstraram menor afinidade pela suramina em relação à tipo selvagem, em ordem crescente, foram: K38A, K123A, K54A e a K15A; sendo esta última, a proteína mutante que reduziu, significativamente, a afinidade pela suramina em relação à tipo selvagem. Já as mutantes K57A, K116A, Δ K57/R58A juntamente com as mutantes da região do sítio ativo H48Q e D49K apresentaram uma maior afinidade pela suramina em relação à tipo selvagem. Esses resultados mostram a presença de dois sítios de ligação da suramina na proteína, uma vez que foi observada a redução de afinidade pelos resíduos K15, na região N-terminal, e K123, na região C-terminal da proteína, corroborando com os dados observados pelos estudos de dinâmica molecular.

PROTEÍNAS	AFINIDADE (µM)
hsPLA ₂ gIIA	6.3
R7A	6.23
K15A	29.2
K38A	7.6
H48Q	5.0
D49K	3.6
K53A	6.4
R54A	13.1
K57A	5.4
R58A	6.7
ΔK57/R58A	3.4
K115A	7.0
K116A	3.9
K123A	9.9

TABELA 1 - Estimativa das constantes da afinidade de suramina pelas proteínas

Comparando esse resultado com os dados de atividade de danificação em membranas de lipossomos, pôde-se observar que as mutantes H48Q e D49K, localizadas no sítio ativo da proteína, que apresentaram uma maior afinidade pela suramina, tiveram sua atividade de liberação inibida em mais de 50%. Por outro lado, as mutantes K15A, R54A e K123A, que tiveram menor afinidade pela suramina, destaque para a primeira, a qual apresentou significativamente menor afinidade dentre todas as proteínas, revelaram uma menor inibição

de suas atividades em relação à proteína tipo selvagem. Esse resultado reforça a sugestão de que estas posições, as quais fazem parte da superfície de reconhecimento interfacial (SRI), responsável pela interação com o substrato, correspondem aos dois sítios de ligação da suramina, além do terceiro sítio na região do sítio ativo da proteína, predito nos testes de simulação e de inibição da atividade hidrolítica protéica.

4.5.4. Avaliação da estrutura secundária da hsPLA₂ gIIA após ligação com a suramina

A avaliação da estrutura secundária da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem, após interação com concentrações crescentes de suramina, foi realizada em espectropolarímetro Jasco 810 com cubeta de quartzo 1 mm e em comprimentos de onda de 200 a 250 nm. A figura 33 mostra os espectros de dicroísmo circular (CD) para 3 μ M (40 μ g/mL) da proteína tipo selvagem na ausência e na presença de suramina. O resultado mostrou que o espectro de CD da proteína tipo selvagem, na ausência de suramina, apresentou dois mínimos em 208 e 222 nm, característico de proteínas ricas em α -hélice. Entretanto, a adição de apenas 5 μ M de suramina alterou, significativamente, a estrutura secundária da proteína, sugerindo que a interação da suramina na proteína promove uma mudança na região das α -hélices.



FIGURA 33: Espectro de dicroísmo circular na região UV-distante de hsPLA₂ gIIA tipo selvagem, na ausência e na presença de suramina. O espectro da proteína, na ausência de suramina, apresentou estrutura secundária com dois mínimos em 208 e 222 nm, característico de proteínas ricas em α -hélice. Concentrações crescentes de suramina entre 5 e 30 μ M alteraram significativamente a estrutura secundária da proteína.

Para avaliar se este efeito é um artefato experimental devido ao espalhamento de intensidade circular diferencial (CIDS – "circular differencial intensity scattering") durante a coleta das medidas dos espectros de CD, outros espectros de CD para as mesmas amostras foram coletados mudando a distância do caminho percorrido pela luz incidente, ou seja, colocando a amostra próxima ao detector (Tinoco *et al.*, 1987). A figura 34 revelou que os perfis dos espectros de CD foram similares aos perfis da figura 33, evidenciando que a diferença entre os espectros na região de 240 a 250 nm foi devida ao espalhamento, o qual se mostrou mínimo em relação a alteração significativa observada na região das α -hélices, reforçando a sugestão de que a suramina causa uma perturbação significativa na estrutura secundária da proteína.



FIGURA 34: Espectro de dicroísmo circular na região UV-distante de hsPLA₂ gIIA tipo selvagem, na ausência e na presença de suramina: inversão da posição da amostra. O espectro da proteína, na ausência de suramina, apresentou estrutura secundária com dois mínimos em 208 e 222 nm, característico de proteínas ricas em α -hélice. Concentrações crescentes de suramina entre 5 e 30 μ M alteraram significativamente a estrutura secundária da proteína.

5.DISCUSSÃO

As proteínas mutantes da hsPLA₂ gIIA, geradas através da técnica de mutagênese por reação em cadeia de polimerase, envolvem aminoácidos da região do sítio ativo da proteína que foram realizadas com o objetivo de eliminar a atividade catalítica da enzima, para avaliarmos se a proteína ainda terá efeito depois de não mais apresentar atividade hidrolítica. No mecanismo de atividade catalítica, o par de aminoácidos H48/D99 é responsável pela abstração dos elétrons da molécula de água que age no ataque nucleofílico da ligação éster *sn*-2 do fosfolipídeo (Scott *et al.*, 1990a). Assim, a substituição de histidina 48 por glutamina (H48Q) elimina a atividade catalítica, porém mantém ligações de hidrogênio, que são essenciais para a manutenção da estabilidade estrutural. Já as mutações G30S e D49K eliminam a capacidade da enzima de hidrolisar fosfolipídios provavelmente por impedir a ligação do cofator Ca²⁺ essencial. (Thunnissen *et al.*, 1990; Verheij *et al.*, 1981).

Além disso, proteínas mutantes de aminoácidos catiônicos que estão expostos ao solvente na superfície protéica também foram feitas para identificar os determinantes estruturais responsáveis pelas interações proteína-substrato. Para esses resíduos catiônicos, foi utilizada a estratégia de mutagênese sítio dirigida por escaneamento de alanina que consiste na substituição sistemática de aminoácidos nativos para resíduos de alanina. A técnica foi originalmente desenvolvida para mapear a superfície de proteínas envolvidas em interações proteína/proteína (Cunningham e Wells, 1989). Estas substituições são freqüentemente direcionadas para aminoácidos específicos que possivelmente são importantes para determinada função. O resíduo de Alanina foi escolhido para esta estratégia porque elimina a presença da cadeia lateral do aminoácido nativo substituindo-a por uma cadeia lateral que não se estende além do carbono β . Isto evidencia o impacto da ausência de determinada cadeia lateral sob determinada função, sem alterar, significativamente, a conformação da cadeia principal, nem impor efeitos estéricos ou eletrostáticos extremos (Raffa, 2002). Essas

proteínas mutantes foram utilizadas no projeto para avaliar o efeito de suramina nas atividades apresentadas pela proteína e para mapear o sítio de ligação da suramina na proteína através do teste de afinidade de suramina medida por fluorescência. Todas essas mutantes foram geradas no DNA codificado da hsPLA₂ gIIA e clonadas no vetor de expressão pET3a. Estes construtos foram transformados na linhagem de *E. coli* BL21(DE3)[pLysS] para a produção de hsPLA₂ gIIA recombinante.

Os protocolos atualmente descritos para obtenção de PLA₂s de veneno envolvem a expressão em *E.coli* (Kelley *et al.*, 1992; Kuo *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 2001), através de proteína de fusão (Giuliani *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2003) ou ainda a expressão de PLA₂s de veneno em hospedeiros eucariotos (Lefkowitz *et al.*, 1999). As PLA₂s do veneno de serpentes freqüentemente são bem expressas por *E.coli* e geralmente não são tóxicas para as células hospedeiras, mas a principal desvantagem é que as PLA₂s dos grupos I e II não são expressas na forma nativa, mas sim como agregados protéicos insolúveis de inclusão devem posteriormente ser solubilizados com desnaturantes químicos e a proteína redobrada na sua conformação nativa através da redução lenta da concentração do agente desnaturante. Além disso, como as PLA₂s dos grupos I e II apresentam de 6 a 8 pontes dissulfeto, o enovelamento protéico deve ser realizado na presença de tampão de oxidação/redução.

Durante a expressão, enovelamento e purificação das proteínas recombinantes, tipo selvagem e mutantes da hsPLA₂ gIIA, observou-se nível variado de expressão dos diferentes mutantes. Embora este efeito possa ter sido causado pela baixa estabilidade do RNA mensageiro, esta variabilidade nos níveis de expressão das diferentes proteínas mutadas não foi investigada. O primeiro passo no processo de purificação das proteínas expressas em *E.coli* BL21 foi o isolamento dos corpos de inclusão. As etapas de purificação dos corpos de

inclusão são fundamentais antes do enovelamento protéico, pois a presença de contaminantes influencia fortemente o processo. Um estudo mostrou que de todos os contaminantes estudados, incluindo DNA, RNA, fosfolipídios e outras proteínas, a presença de proteínas contaminantes é o fator que mais interfere no rendimento protéico final (Batas e Chaudhuri, 1999).

Protocolos de enovelamento protéico usando uma resina de filtração em gel foram relatados e este método tem sido utilizado com sucesso para redobrar corpos de inclusão da hsPLA₂ gIIA (Ward *et al.*, 2001). A difusão reduzida das proteínas em coluna de filtração em gel suprime as interações não específicas de moléculas parcialmente redobradas, reduzindo assim a agregação (Batas e Chaudhuri, 1996). Outra etapa importante do processo de enovelamento é a quantidade de hidrocloreto de guanidina (GdnHCl), um agente desnaturante que interage com o solvente, causando destruição do arranjo estrutural existente entre as moléculas de água e a proteína. A perda desse arranjo reduz as interações hidrofóbicas que estabilizam a molécula, permitindo assim maior flexibilidade. No caso da hsPLA₂ gIIA, a concentração de 0,3 M foi ideal para a estabilidade relativa das interações hidrofóbicas essenciais para o equilíbrio termodinâmico da estrutura nativa, aumentando assim o rendimento. Além disso, foi utilizado 1 mM do cofator Ca²⁺, que aumentou significativamente o rendimento final do processo.

No processo de purificação por cromatografia de troca catiônica, o tempo de eluição das mutantes foi similar ao tempo de eluição da forma nativa. A análise da estrutura secundária das proteínas recombinantes é fundamental para eliminar as proteínas recombinantes mutadas com conformação estrutural não nativa. A ligação peptídica é rígida e planar, e a rotação em volta do C α é limitada por impedimento estérico das cadeias laterais dos aminoácidos vizinhos. Isso faz com que certas conformações da cadeia principal sejam energicamente favorecidas. O conjunto limitado de arranjos das ligações peptídicas tem sinais

bem definidos de CD, e a soma das contribuições resulta num espectro que é característico de cada proteína (Gore, 1998). Os resultados de CD na região UV-distante (200-250nm), mostraram que todas as proteínas mutantes renoveladas apresentaram estrutura secundária semelhante à da proteína tipo selvagem. Este resultado era esperado, pois a maioria das mutações envolve resíduos voltados para o solvente e, portanto não foram previstas alterações significativas nas conformações das proteínas mutadas.

A proposta do envolvimento da hidrólise nas atividades da hsPLA₂ gIIA foi avaliada através das proteínas mutantes da região do sítio ativo. Um ensaio com o conjugado ADIFAB foi realizado para avaliar a capacidade das proteínas mutadas no sítio ativo de hidrolisar fosfolipídios. A enzima tipo selvagem apresentou atividade hidrolítica específica contra vesículas unilamelares compostas de DOPC:DOPG de 271 µM.min⁻¹.mg⁻¹ e este resultado está de acordo com a atividade desta enzima relatada na literatura (Baker *et al.*, 1998; Singer et al., 2002). Sabe-se que a mutação G30S reduz em mais de 10 vezes a afinidade pelo cofator Ca^{2+} e isso acarreta uma drástica redução na atividade catalítica da enzima (Bekkers *et al.*, 1991). Além disso, a mutação H48Q demonstra uma atividade catalítica residual sobre vesículas unilamelares pequenas de DOPG de 2,8% comparado à atividade da enzima tipo selvagem (Edwards et al., 2002). Esses dados corroboram com nossos estudos, uma vez que as atividades residuais observadas para as mutantes G30S e H48Q foram aproximadamente 0,1% da enzima tipo selvagem. Por outro lado, a atividade residual apresentada pela mutante D49K de aproximadamente 0,02% em relação à proteína tipo selvagem foi um resultado inesperado, pois um estudo realizado por LI e colaboradores (1994) com mutantes D49N, D49E, D49Q, D49K e D49A da PLA₂ pancreática bovina mostrou que de todas as proteínas mutadas na posição 49, a única que manteve uma capacidade 12 vezes menor de ligação de Ca²⁺ em relação à proteína tipo selvagem, foi a mutante conservativa D49E. Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que a atividade enzimática residual das mutantes G30S, H48Q e D49K da hsPLA₂ gIIA é dependente de Ca²⁺, pois na presença de EGTA a atividade hidrolítica foi abolida. Desse modo, essas proteínas mutantes, com atividade enzimática residual, foram utilizadas nos estudos das atividades da hsPLA₂ gIIA para caracterização de mecanismo dependente ou independente de hidrólise.

Sabe-se que a ativação da resposta imune inata pode ser induzida através de diferentes estímulos, como agentes infecciosos e seus produtos, materiais tóxicos, traumas, partículas ou células estranhas, que resultam na síntese de diferentes mediadores. O principal reflexo da resposta imune inata é o processo inflamatório que compreende uma série de eventos complexos e culminam em alteração da microvasculatura e no recrutamento celular, e que tem como sinais cardinais a dor, o calor, o rubor, o tumor (ou edema). Alguns estudos têm mostrado que PLA₂s secretadas (sPLA₂s) contribuem para a biosíntese de mediadores lipídios em células inflamatórias, tais como: mastócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (Triggiani et al., 2006). Entre estes mediadores podemos citar citocinas, quimiocinas, proteínas do sistema do complemento e os derivados dos fosfolipídeos de membrana, como o Fator Ativador de Plaquetas (PAF), metabólitos do Ácido Araquidônico (AA) ou leucotrienos e prostaglandinas (Funk, 2001; Luster e Tager, 2004; Triggiani et al., 2006). O mecanismo, pelo qual as sPLA₂s atuam nestes processos, ainda é desconhecido. Evidências sugerem que a atividade catalítica destas proteínas é o principal mecanismo de ação em tais efeitos (Gelb et al., 1995; Kudo e Murakami, 2002). Entretanto, alguns autores relatam que a ativação de células inflamatórias é provocada pela interação das sPLA₂s com receptores específicos (Lambeau e Lazdunski, 1999; Triggiani et al., 2005; Valentin e Lambeau, 2000). Por exemplo, sPLA₂s cataliticamente inativas ainda induzem inflamação (Fonteh et al., 2001; Triggiani *et al.*, 2003).

A hsPLA₂ gIIA foi inicialmente caracterizada como uma enzima secretada encontrada no fluido sinovial (Kramer *et al.*, 1989; Seilhamer *et al.*, 1989). Portanto, estudos subseqüentes têm demonstrado um amplo padrão de expressão em tecidos humanos sendo encontrada em macrófagos (Inada *et al.*, 1991), células Paneth do intestino (Nevalainen e Haapanen, 1993; Qu *et al.*, 1996), células da glândula lacrimal (Aho *et al.*, 1996; Nevalainen *et al.*, 1994), plaquetas (Kramer *et al.*, 1989), neutrófilos (Wright *et al.*, 1990) e mastócitos (Murakami *et al.*, 1992). A hsPLA₂ gIIA é considerada uma proteína de fase aguda da resposta imunológica, pois sua expressão é induzida por endotoxinas e citocinas via processos autócrinos e/ou parácrinos durante processos inflamatórios (Crowl *et al.*, 1991).

Na avaliação do potencial de ativação da hsPLA₂ gIIA sobre células de macrófagos, duas linhagens foram utilizadas, sendo uma de célula humana (U937) e a outra de células peritoneais de camundongo Balc/c (RAW 264.7). O ensaio fundamentou-se na incubação das respectivas células com diferentes concentrações da proteína tipo selvagem para posterior quantificação do nitrito produzido. O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa do nitrogênio e está envolvida na regulação de diversos mecanismos fisio-patofisiológicos nos sistemas cardiovascular, nervoso e imunológico. Esse radical livre pode agir como um agente citotóxico intra e extracelular em processos patológicos, particularmente em desordens inflamatórias (Jancar e Sanchez Crespo, 2005; Suschek *et al.*, 2004). Portanto, células de macrófagos, quando ativadas, liberam NO, produto catalisado pela enzima NO sintase (Griffith e Stuehr, 1995; Lorsbach *et al.*, 1993; Macmicking *et al.*, 1997; Nathan, 1992). A escolha deste método foi feita devido a sua alta viabilidade, a qual é conferida pelo seu baixo custo e fácil manipulação.

Dessa forma, a avaliação dos resultados para as células de macrófagos U937 mostrou ausência de ativação, uma vez que a produção de nitrito, metabólito estável do NO, para todas as concentrações utilizadas de proteína tipo selvagem, manteve-se no nível basal do controle negativo (células sem estímulo). O controle positivo foi feito com LPS, pois, como outras substâncias, este composto promove a ativação de células de macrófagos (Macmicking *et al.*,

1997; Nathan, 1992; Terenzi *et al.*, 1995). Devido à falta de estímulo da ativação dessas células pelo LPS, resultado não esperado, e a ausência do efeito da hsPLA₂ gIIA, os estudos com essa linhagem não foram continuados.

O potencial de ativação de macrófagos da linhagem RAW 264.7 pela ação da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem também foi avaliado e para eliminar qualquer traço contaminante de LPS proveniente da preparação da proteína recombinante expressada em *E.coli*, todos os testes foram feitos na presença de polimixina, um composto que interage com o LPS, bloqueando o seu acesso aos receptores celulares e assim neutralizando seu efeito (Delehanty *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 1986; Shimomura *et al.*, 2003). Assim, a avaliação dos resultados mostrou que o efeito de ativação de macrófagos RAW 264.7 pela ação da hsPLA₂ gIIA foi dependente da concentração da mesma, uma vez que a produção de nitrito para todas as concentrações aumentou significativamente em relação ao controle negativo (p≤0,05) e que nessas concentrações não houve citotoxicidade à célula.

O mecanismo de ação da hsPLA₂ gIIA na ativação de macrófagos foi avaliado, através da utilização das proteínas mutantes do sítio ativo para caracterizar se essa atividade é ou não dependente de catálise. A concentração de nitrito produzida pelas células RAW 264.7 quando incubadas com as proteínas mutantes G30S, H48Q e D49K mostrou-se drasticamente reduzida em relação à proteína tipo selvagem. Esse resultado corrobora com os estudos encontrados na literatura, reforçando a sugestão de que a atividade de ativação de macrófagos RAW 264.7 da hsPLA₂ gIIA é dependente de catálise.

Uma grande variedade de inibidores de PLA₂s é encontrada na literatura, atuando contra os efeitos inflamatórios destas enzimas (Chandra *et al.*, 2002b; Church *et al.*, 2001; Mihelich e Schevitz, 1999; Ripka *et al.*, 1989). A maioria é composta de inibidores competitivos que competem com o substrato fosfolipídico pelo sítio ativo da enzima. Muitos outros compostos também foram identificados como inibidores competitivos de PLA₂s, dentre eles estão: compostos indólicos (Bernard *et al.*, 2001; Dillard *et al.*, 1996; Draheim *et al.*, 1996), peptídeos sintéticos (Chandra *et al.*, 2002b), vitamina E (Chandra *et al.*, 2002a; Pentland *et al.*, 1992; Traber e Packer, 1995), flavonóides (Lindahl e Tagesson, 1997) e outras substâncias. É sabido, que suramina é um derivado de naftiluréia polissulfonado conhecido por apresentar atividade anti-tripanossomal (Den Hertog *et al.*, 1989; Nakazawa *et al.*, 1991) e possui a capacidade de ligação em uma variedade de proteínas, tais como, fator de crescimento derivado de plaquetas (Hosang, 1985; Huang e Huang, 1988) e fator de crescimento de fibroblastos (Rifkin e Moscatelli, 1989). Arruda e colaboradores (2002) relataram que a suramina reduz a atividade miotóxica *in vivo* do veneno de *B. jararacussu*. A pré-incubação de suramina com a PLA₂-Lys49 (BthTX-I) a 37°C por 15 minutos aboliu as atividades de paralisação muscular e danificação muscular induzidas por BthTX-I (De Oliveira *et al.*, 2003). Diante da alta similaridade na seqüência de aminoácidos entre a BthTX-I e a hsPLA₂ gIIA merecem ser investigadas, pois a busca de novos inibidores de PLA_ss favorecem o tratamento de doenças inflamatórias.

Dessa maneira, o efeito da suramina na atividade de ativação de macrófagos da hsPLA₂ gIIA foi avaliado. A concentração de proteína utilizada foi de 50 µg/mL, pois além de não apresentar citotoxicidade, esta confere uma ativação de aproximadamente 50 %. Além disso, o controle experimental com apenas suramina não causou citotoxicidade e nem ativação das células. O resultado demonstrou que a suramina inibiu essa atividade de maneira dose-dependente, reduzindo a atividade da proteína tipo selvagem em 68% com apenas 100 µM de suramina. Sabendo que, segundo nossos estudos, a atividade de ativação de macrófagos RAW 264.7 da hsPLA₂ gIIA tipo selvagem é dependente da catálise, este resultado sugere a possibilidade de um sitio de ligação da suramina na proteína, uma vez que a aquela está impedindo a interação do substrato na enzima.

Sabe-se que, em fluidos inflamatórios, a hsPLA₂ gIIA é o agente bactericida primário contra bactérias Gram-positivas e seu efeito pode ser aumentado pela presença de fatores do plasma do hospedeiro (como por exemplo, proteínas do complemento). Por outro lado, nas concentrações encontradas nos fluidos extracelulares (1 µg/mL), esta enzima sozinha não tem atividade bactericida independente contra bactérias Gram-negativas e não degrada os fosfolipídios da membrana bacteriana. Sua contribuição na destruição destas bactérias depende inteiramente da ação de outros fatores antimicrobianos do hospedeiro, como a proteína de aumento de permeabilidade bactericida (BPI) derivada de neutrófilos e complexos de ataque à membrana do complemento, que promovem alterações subletais do envelope externo destas bactérias (Elsbach *et al.*, 1994; Levy *et al.*, 1994). Porém, já está estabelecido na literatura o efeito bactericida da hsPLA₂ gIIA contra linhagens Gram-positivas (Beers *et al.*, 2002; Laine *et al.*, 1999; Weinrauch *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1994).

O efeito das cargas positivas sobre a atividade bactericida da hsPLA₂ gIIA contra linhagens Gram-positivas foi investigado através de mutagênese de carga reversa, ou seja, substituição de resíduos positivamente carregados por resíduos negativos (Beers *et al.*, 2002; Koduri *et al.*, 2002). O mecanismo bactericida proposto através deste estudo sugere que a morte bactericida provocada pela hsPLA₂ gIIA é causada pela hidrólise dos fosfolipídios de membrana, um evento que é possível apenas depois da penetração na parede celular da bactéria. Uma característica de destaque da enzima humana é o alto valor de ponto isoelétrico (pI) devido ao excesso de cargas positivas na superfície da proteína. Na análise de BEERS e colaboradores (2002), foram utilizados mutantes duplos, triplos, quádruplos e quíntuplos, cujos aminoácidos positivos foram substituídos por aminoácidos negativamente carregados. A redução de cargas positivas foi diretamente relacionada à perda da capacidade de matar bactérias e essa diminuição foi atribuída à perda de capacidade de penetração na parede celular e conseqüentemente diminuição da hidrólise dos fosfolipídios de membrana. Em

adição, quando a barreira imposta pela parede celular foi previamente permeabilizada pelo tratamento com lisozima, as mutantes de carga reversa foram altamente efetivas em hidrolisar a membrana bacteriana. O modelo proposto por BEERS e colaboradores (2002) envolve múltiplas interações eletrostáticas entre a enzima e a parede celular da bactéria que aumentariam a concentração de proteína total na superfície celular e promoveriam a passagem através de poros aniônicos como resultado da formação e quebra contínua de pontes de hidrogênio. Neste modelo proposto para o mecanismo bactericida exercido pela hsPLA2 gIIA sugere que a atividade hidrolítica é o fator essencial para o efeito apresentado sobre bactérias. A proposta do envolvimento da hidrólise na atividade bactericida foi avaliada através de mutagênese sítio-dirigida na região do sítio ativo da hsPLA2 gIIA para eliminar a atividade hidrolítica (Chioato, 2004). Os resultados demonstraram que as mutações G30S, H48Q e D49K no sítio ativo da enzima diminuíram o efeito bactericida total em relação ao efeito proporcionado pela enzima tipo selvagem, porém um efeito bactericida significativo ainda é apresentado por estas mutantes. Estes resultados sugeriram que a hidrólise fosfolipídica não é única e exclusivamente o fator essencial para o efeito bactericida apresentado pela hsPLA₂ gIIA como atualmente proposto.

Para avaliar a função dos resíduos positivamente carregados no efeito bactericida apresentado pela hsPLA₂ gIIA contra a linhagem Gram-positiva, *Micrococcus luteus*, as proteínas mutantes foram utilizadas (Chioato, 2004). As mutações pontuais da hsPLA₂ gIIA analisadas neste trabalho, não provocaram nenhuma diferença significativa em relação ao efeito bactericida apresentado pela enzima tipo selvagem. Isto sugere que a retirada de cargas positivas individuais não altera o efeito em relação à capacidade de penetrar na parede celular altamente aniônica de bactérias Gram-positivas. Quando as cargas positivas são mantidas inalteradas, e resíduos do sítio ativo são modificados, a hsPLA₂ gIIA ainda apresenta efeito bactericida em baixas concentrações. Apesar de o efeito bactericida ser reduzido em relação ao apresentado pela proteína tipo selvagem, os resultados sugerem que a hidrólise dos fosfolipídios de membrana não é o único fator responsável pela atividade bactericida causada por esta proteína.

Diante destes fatos, a linhagem da bactéria Gram-positiva (*Micrococcus luteus*) foi utilizada como sistema modelo para avaliar o efeito de suramina na atividade bactericida apresentada por hsPLA₂ gIIA. Utilizando a técnica de contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) em placas de Petri, a incubação de células bacterianas com uma mistura de hsPLA₂ gIIA tipo selvagem e concentrações crescentes entre 0,5 e 30 µM de suramina mostrou ausência de efeito de redução do número de CFU para suramina sozinha. A hsPLA₂ gIIA, na ausência de suramina, apresentou uma diminuição de 85 % do número de CFU. Entretanto, na presença de concentrações crescentes de suramina, a atividade bactericida da proteína tipo selvagem apresentou 90 % de redução do número de CFU, demonstrando que a interação de suramina com a proteína tipo selvagem não altera, significativamente, sua atividade bactericida contra *M. luteus*.

O efeito de suramina na atividade bactericida da hsPLA₂ gIIA também foi avaliado através da técnica de citometria de fluxo. Para avaliar o efeito da permeabilidade da membrana citoplasmática da bactéria, uma sonda de viabilidade celular foi utilizada. Células em condições sadias excluem a sonda e não emite fluorescência, entretanto células mortas ou com a membrana citoplasmática comprometida incorporam o marcador de ácidos nucléicos, aumentando, assim, a fluorescência detectável no citoplasma. Dentre as sondas mais utilizadas estão: "sytox green", oxonol, rodamina, iodeto de propídio e TO-PRO-1 e a maioria dos estudos encontrados na literatura, que utilizam tais sondas, investiga a susceptibilidade e viabilidade bacteriana devido à ação de agentes antimicrobianos (Gant *et al.*, 1993; Lebaron *et al.*, 1998; Mortimer *et al.*, 2000; Roth *et al.*, 1997). Com base nesses estudos, a sonda sytox green (SG) foi utilizada para investigar o efeito bactericida da hsPLA₂ gIIA à nível da integridade da membrana citoplasmática de *Micrococcus luteus*.

Utilizando as mesmas condições experimentais do teste de contagem de CFU em placas de Petri, a análise por citometria de fluxo foi realizada. Durante a análise experimental, o controle positivo mostrou que todas as células bacterianas foram permeabilizadas quando aquecidas, representando a porcentagem total de permeabilização das células e as células bacterianas que foram incubadas com suramina revelaram o mesmo perfil do controle negativo, ou seja, baixa intensidade de fluorescência da sonda, evidenciando que suramina sozinha não apresenta efeito bactericida. Além disso, 80% das células que foram tratadas com hsPLA₂ gIIA foram permeabilizadas. Entretanto, a porcentagem de permeabilização das células tratadas com uma mistura de suramina e proteína foi idêntica àquela provocada pela proteína sozinha, mostrando ausência de efeito de inibição da suramina na atividade bactericida da proteína (ver figura 21). Portanto, as duas técnicas utilizadas mostraram um resultado inesperado, em que a suramina não inibiu a atividade bactericida da proteína e nem a penetração desta na membrana plasmática bacteriana. A ocorrência desse fenômeno pode ser sugerido pela dissociação do complexo suramina/hsPLA2 gIIA em algum ponto entre a associação com a membrana externa da M. luteus e a interação da enzima com a membrana interna bacteriana. Sabe-se que a membrana externa bacteriana apresenta natureza aniônica e isso pode acarretar em uma competição entre os componentes aniônicos bacterianos com os resíduos catiônicos da proteína envolvidos na ligação com a suramina, levando à dissociação do complexo.

Membranas de lipossomos multilamelares compostas de fosfolipídios carregados negativamente, tais como fosfatidilglicerol (PG), encontrados em membranas bacterianas, são mais suscetíveis aos danos causados pela hsPLA₂ gIIA (Snitko *et al.*, 1997). Por outro lado, a hsPLA₂ gIIA liga-se fracamente a interfaces zwiteriônicas presente em membranas celulares

de eucariotos (Bayburt *et al.*, 1993). Esta dependência de bicamadas carregadas negativamente sugere o envolvimento de aminoácidos básicos no efeito de danificação da membrana, talvez no passo de ligação da proteína com a membrana. Após a caracterização dos testes de liberação com diferentes misturas lipídicas (dados não mostrados), a mistura de DOPC:DOPG foi escolhida, pois esta apresenta uma maior aproximação com a composição de membranas biológicas e porque tem sido ostensivamente utilizada na literatura para o entendimento do mecanismo de ação da proteína (Baker *et al.*, 1998; Beers *et al.*, 2003). Dessa maneira, o efeito de suramina na atividade de danificação de membranas independente de Ca²⁺ da hsPLA₂ gIIA, ou seja, independente de hidrólise, contra lipossomos compostos de fosfolipídios de 50% de DOPC e 50% de DOPG foi avaliado no presente trabalho. Concentrações crescentes de suramina entre 0,25 e 12 μ M foram adicionadas à proteína, na concentração fixa 4 μ g/mL e o resultado revelou que a suramina reduziu a atividade de danificação de membrana da proteína gradativamente. Esse efeito de inibição refletiu um comportamento com dois patamares sugerindo a existência de múltiplos sítios de ligação da suramina na proteína.

Com o intuito de mapear o sítio de ligação da suramina responsável pela inibição da atividade de danificação da hsPLA₂ gIIA, o efeito da suramina na atividade de liberação de calceína das proteínas mutantes também foi avaliado. O resultado mostrou que a suramina inibiu com maior intensidade a atividade de liberação das mutantes H48Q, D49K e K116A em relação à proteína tipo selvagem. Já para as proteínas mutantes R7A, K15A, R54A, R58A e K123A, a suramina inibiu de maneira reduzida a atividade de liberação em relação à tipo selvagem, sugerindo que estes resíduos são os responsáveis pelos dois sítios de ligação com a suramina.

Em seguida, o efeito de suramina na atividade hidrolítica da hsPLA₂ gIIA foi investigado, utilizando as proteínas mutantes da região do sítio ativo. Concentrações

crescentes de suramina foram adicionadas à proteína e o resultado mostrou que a suramina impede a interação do substrato com o sítio ativo da enzima, uma vez que inibiu sua atividade hidrolítica gradativamente, chegando a uma redução de 87% da atividade da proteína com 100 nM de suramina. Esse dado evidencia a existência de mais um sítio de ligação da suramina na proteína, além dos dois sugeridos anteriormente.

A partir desses resultados, uma caracterização estrutural foi feita para investigar parâmetros termodinâmicos e de energia potencial da interação do complexo suramina/hsPLA₂ gIIA, através da utilização da técnica de dinâmica molecular (DM). Os resultados de simulação molecular mostraram que existem duas configurações alternativas para a interação do complexo. Em ambas as configurações a região SUR-1 da suramina encontra-se localizada na superfície que forma a região do sitio ativo/ligação do substrato. Em CONF-1, a região SUR-2 da suramina está em contato com o resíduo K15 da região N-terminal da proteína, e em CONF-2, a região SUR-2 da suramina está orientada para o resíduo K116 localizado na região C-terminal (ver figuras 27 B e 27 C). As regiões em torno dos resíduos K15 e K116 são ricas em resíduos carregados positivamente e, portanto, satisfazem o critério chave para os potenciais sítios de ligação da suramina polianiônica.

Todas as PLA₂s apresentam uma superfície altamente conservada, chamada de sítio de reconhecimento interfacial (SRI), que define a superfície que faz contato com a membrana fosfolipídica (Pieterson *et al.*, 1974). Esta superfície inclui o sítio ativo (Ramirez e Jain, 1991; Scott e Sigler, 1994) e nos grupos I/II é definida por uma fenda na superfície hidrofóbica altamente conservada que liga a cadeia de ácido graxo do substrato fosfolipídico, juntamente com um anel de resíduos carregados e polares ao redor desses resíduos hidrofóbicos. Na hsPLA₂ gIIA, os resíduos localizados no loop da região C-terminal contribuem para a SRI, e a mutagênese de carga-reversa de resíduos catiônicos nesta região reduzem a atividade catalítica, sugerindo que interações eletrostáticas com membranas fosfolipídicas carregadas

negativamente medeiam o contato deste loop com a membrana (Beers *et al.*, 2002; Koduri *et al.*, 2002). Além disso, resíduos da região N-terminal da hsPLA₂ gIIA também contribuem para a SRI da proteína (Beers *et al.*, 2002; Koduri *et al.*, 2002), portanto todas as regiões identificadas como sítios de ligação da suramina nos estudos de DM fazem parte da superfície de interação da proteína com a membrana fosfolipídica. A interação da suramina com a hsPLA₂ gIIA pode, portanto, interferir não apenas na interação da proteína com a membrana, mas também poderia competir diretamente com o acesso do substrato pelo sítio ativo.

A energia potencial intermolecular (PE), avaliada pela técnica de simulação molecular, foi utilizada também para caracterizar em mais detalhes as regiões da proteína que podem estar envolvidas na formação do complexo suramina/hsPLA₂ gIIA. Os resultados sugerem que a simulação inteira da CONF-2 é favorecida por uma diferença da energia potencial de -15.0 kJ.mol⁻¹ (ver figura 28). Além disso, os desvios padrões das energias potenciais são reduzidos na simulação CONF-2 em comparação com a CONF-1, a qual é característica de uma conformação mais estável. As diferenças observadas na energia potencial total (PE₈) durante a simulação (figura 28, painel inferior) refletem as diferentes interações da região SUR-2 da suramina com a proteína nas conformações CONF-1 e CONF-2.

Portanto, a predição dos estudos de DM identificou 3 regiões que podem estar envolvidas na interação do complexo suramina/hsPLA₂ gIIA. Esses dados corroboram com os resultados obtidos, já relatados anteriormente, tanto pelo efeito de inibição da suramina na hidrólise da hsPLA₂ gIIA, que sugere o impedimento da ligação do substrato no sitio ativo, quanto pelos dados obtidos da atividade de liberação de calceína em lipossomos, que também identificaram dois sítios de ligação com resíduos das regiões N- e C-terminal. Esta predição foi verificada usando a técnica de calorimetria de titulação isotérmica (CTI), cujo resultado identificou uma interação de modelo independente com 2.7 sítios de ligação da suramina por molécula de proteína. Dessa forma, os resultados experimentais de CTI sugerem que a hsPLA₂ gIIA apresenta três sítios de ligação da suramina e pela análise de características eletrostáticas das duas moléculas envolvidas na formação do complexo foi possível predizer duas configurações de ligação da suramina baseada nas interações de grupos carregados através da técnica de DM.

A partir desses dados, a estrutura secundária da proteína, quando a mesma interage com a suramina, foi avaliada através de dicroísmo circular (CD) e o resultado mostrou que a suramina promoveu alterações na estrutura secundária da proteína. Este efeito no espectro de CD pode ser devido a duas contribuições: a absorção circular diferencial e o espalhamento circular diferencial (Tinoco *et al.*, 1987). Um teste simples para verificar contribuições de espalhamento diferencial é mover a amostra em relação ao detector. Isso acontece porque a influência do espalhamento é dependente da detecção de fótons em todos os ângulos e movendo-se a amostra, muda-se a fração de luz diferencialmente espalhada capturada pelo detector. Medidas de CD foram feitas, colocando a amostra em duas posições diferentes em relação ao detector, uma na posição normal (distante do detector) e a outra próxima ao detector. O resultado para ambas as posições mostrou que o espectro de CD da proteína tipo selvagem, na ausência de suramina, apresentou dois mínimos em 208 e 222 nm, característico de proteínas ricas em α -hélice. Entretanto, a adição de apenas 5 μ M de suramina alterou significativamente a estrutura secundária da proteína, sugerindo que a interação da suramina na proteína promove uma distorção nas α -hélices.

Para dar continuidade aos estudos de caracterização estrutural da interação do complexo suramina/hsPLA₂ gIIA, a técnica de fluorescência foi utilizada para mapear os sítios de ligação da suramina, através do uso de mutantes sítios-dirigidos da hsPLA₂ gIIA. Os testes de afinidade da suramina com a hsPLA₂ gIIA tipo selvagem mostraram que há dependência entre o aumento da intensidade de fluorescência da suramina, quando o mesmo

interage com a proteína, e a concentração de suramina. Além disso, essa interação ocorre na faixa de concentração em micromolar e apresenta um perfil com comportamento sigmoidal. As proteínas mutantes foram avaliadas da mesma maneira e mantiveram o perfil de comportamento sigmoidal observado para a proteína tipo selvagem. A presença das mutações pontuais em hsPLA₂ gIIA, que diminuíram a afinidade pela suramina em relação à proteína tipo selvagem, foram apenas nos resíduos K38, K123, K54 e o K15. Esse resultado sugere que estas posições, as quais não fazem parte do sítio ativo da proteína, correspondem aos sítios de ligação da suramina. Por outro lado, as mutantes K57A, K116A, Δ K57/R58A juntamente com as mutantes da região do sítio ativo H48Q e D49K apresentaram uma maior afinidade pela suramina em relação à tipo selvagem. Este resultado revela que a maior interação da suramina com o sítio ativo, se deve, porque as duas substituições introduzem grupos –NH₂, o que pode aumentar assim sua interação com grupos –SO₄ da suramina.

Ao comparar esse resultado com os dados de atividade de liberação de calceína em lipossomo, apresentados anteriormente, foi observado que as mutantes H48Q e D49K, localizadas no sítio ativo da proteína, que apresentaram uma maior afinidade pela suramina, tiveram sua atividade de liberação inibida em mais de 50%. Por outro lado, as mutantes K15A, R54A e K123A, que tiveram menor afinidade pela suramina, revelaram uma menor inibição de suas atividades em relação à proteína tipo selvagem. Este resultado reforça a sugestão de que estas posições correspondem aos dois sítios de ligação da suramina, assim como os sítios preditos na simulação.

6.CONCLUSÕES

- Foi demonstrado que a suramina apresenta uma afinidade pela proteína tipo selvagem em escala micromolar.
- 2. A suramina não alterou a atividade bactericida da enzima, mas inibiu a atividade de danificação de membranas independente de Ca²⁺ e de ativação de macrófagos de linhagem RAW 264.7, evidenciando que as regiões da proteína responsáveis por estas atividades são diferentes.
- **3.** A ativação de macrófagos de linhagem RAW 264.7 da hsPLA₂ gIIA mostrou-se dependente de hidrólise.
- 4. Os resultados experimentais do efeito da suramina na atividade de liberação de calceína e na atividade de hidrólise da proteína corroboraram com os dados experimentais da CTI juntamente com os resultados avaliados pela técnica de dinâmica molecular, indicando a existência de 3 sítios de ligação da suramina na hsPLA₂ gIIA, sendo assim localizados em: 1) região do sítio ativo/ligação do substrato; 2) na região ao redor do resíduo K15 da região N-terminal e 3) na região ao redor do resíduo K116 da região C-terminal da proteína.
- Os resultados deste trabalho permitem concluir que a suramina pode ser considerada um novo tipo de inibidor de PLA₂s.

7. REFERÊNCIAS

Aho, H. J., Saari, K. M., Kallajoki, M. e Nevalainen, T. J. Synthesis of group II phospholipase A2 and lysozyme in lacrimal glands. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.37, n.9, Aug, p.1826-32. 1996.

Arbuck, S. G., Sorensen, J. M., Christian, M. C., Ho, P., Pluda, J. M. e Cheson, B. D. New drugs in non-Hodgkin's lymphoma. Ann Oncol, v.8 Suppl 1, p.119-28. 1997.

Arni, R. K. e Ward, R. J. Phospholipase A2--a structural review. Toxicon, v.34, n.8, Aug, p.827-41. 1996.

Arruda, E. Z., Silva, N. M., Moraes, R. A. e Melo, P. A. Effect of suramin on myotoxicity of some crotalid snake venoms. Braz J Med Biol Res, v.35, n.6, Jun, p.723-6. 2002.

Baek, S. H., Kwon, T. K., Lim, J. H., Lee, Y. J., Chang, H. W., Lee, S. J., Kim, J. H. e Kwun, K. B. Secretory phospholipase A2-potentiated inducible nitric oxide synthase expression by macrophages requires NF-kappa B activation. J Immunol, v.164, n.12, Jun 15, p.6359-65. 2000.

Baek, S. H., Lim, J. H., Park, D. W., Kim, S. Y., Lee, Y. H., Kim, J. R. e Kim, J. H. Group IIA secretory phospholipase A(2) stimulates inducible nitric oxide synthase expression via ERK and NF-kappaB in macrophages. Eur J Immunol, v.31, n.9, Sep, p.2709-17. 2001.

Baker, S. F., Othman, R. e Wilton, D. C. Tryptophan-containing mutant of human (group IIa) secreted phospholipase A2 has a dramatically increased ability to hydrolyze phosphatidylcholine vesicles and cell membranes. Biochemistry, v.37, n.38, Sep 22, p.13203-11. 1998.

Bartlett, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. J Biol Chem, v.234, n.3, Mar, p.466-8. 1959.

Batas, B. e Chaudhuri, J. B. Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. Biotechnol Bioeng, v.50, n.1, Apr 5, p.16-23. 1996.

Batas, B. e Chaudhuri, J. B. Considerations of sample application and elution during size-exclusion chromatography-based protein refolding. J Chromatogr A, v.864, n.2, Dec 24, p.229-36. 1999.

Bayburt, T., Yu, B. Z., Lin, H. K., Browning, J., Jain, M. K. e Gelb, M. H. Human nonpancreatic secreted phospholipase A2: interfacial parameters, substrate specificities, and competitive inhibitors. Biochemistry, v.32, n.2, Jan 19, p.573-82. 1993.

Beers, S. A., Buckland, A. G., Giles, N., Gelb, M. H. e Wilton, D. C. Effect of tryptophan insertions on the properties of the human group IIA phospholipase A2: mutagenesis produces an enzyme with characteristics similar to those of the human group V phospholipase A2. Biochemistry, v.42, n.24, Jun 24, p.7326-38. 2003.

Beers, S. A., Buckland, A. G., Koduri, R. S., Cho, W., Gelb, M. H. e Wilton, D. C. The antibacterial properties of secreted phospholipases A2: a major physiological role for the group IIA enzyme that depends on the very high pI of the enzyme to allow penetration of the bacterial cell wall. J Biol Chem, v.277, n.3, Jan 18, p.1788-93. 2002.

Bekkers, A. C., Franken, P. A., Van Den Bergh, C. J., Verbakel, J. M., Verheij, H. M. e De Haas, G. H. The use of genetic engineering to obtain efficient production of porcine pancreatic phospholipase A2 by Saccharomyces cerevisiae. Biochim Biophys Acta, v.1089, n.3, Jul 23, p.345-51. 1991.

Berendsen, H. J. C., J.P.M. Postma, Dinola, A. e And Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. J. Chem. Phys, v.81, p.3684-3690. 1984.

Berendsen, H. J. C., J.P.M. Postma, W.F., V. G. e And Hermans J. Interactions models for water in relation to protein hydration. In B. Pullman, Editor, Intermolecular Forces. Reidel Publishing Company, Dordrecht, p.331-342. 1981.

Berg, O. G., Gelb, M. H., Tsai, M. D. e Jain, M. K. Interfacial Enzymology: The secreted phospholipases A2-paradigm. Chem. Rev., v.101, p.2613-2653. 2001.

Bernard, P., Pintore, M., Berthon, J. Y. e Chretien, J. R. A molecular modeling and 3D QSAR study of a large series of indole inhibitors of human non-pancreatic secretory phospholipase A2. Eur J Med Chem, v.36, n.1, Jan, p.1-19. 2001.

Bhargava, S., Hotz, B., Hines, O. J., Reber, H. A., Buhr, H. J. e Hotz, H. G. Suramin inhibits not only tumor growth and metastasis but also angiogenesis in experimental pancreatic cancer. J Gastrointest Surg, v.11, n.2, Feb, p.171-8. 2007.

Brunie, S., Bolin, J., Gerwith, D. e Sigler, P. B. The Refined Crystal Structure of Dimeric Phospholipase A2 at 2.5Å. Access to a shielded catalytic site. J. Biol. Chem., v.260, p.9742-9749. 1985.

Buckland, A. G. e Wilton, D. C. The antibacterial properties of secreted phospholipases A(2). Biochim Biophys Acta, v.1488, n.1-2, Oct 31, p.71-82. 2000.

Burch, T. A. e Ashburn, L. L. Experimental therapy of onchocerciasis with suramin and hetrazan; results of a three-year study. Am J Trop Med Hyg, v.31, n.5, Sep, p.617-23. 1951.

Chandra, V., Jasti, J., Kaur, P., Betzel, C., Srinivasan, A. e Singh, T. P. First structural evidence of a specific inhibition of phospholipase A2 by alpha-tocopherol (vitamin E) and its implications in inflammation: crystal structure of the complex formed between phospholipase A2 and alpha-tocopherol at 1.8 A resolution. J Mol Biol, v.320, n.2, Jul 5, p.215-22. 2002a.

Chandra, V., Jasti, J., Kaur, P., Dey, S., Srinivasan, A., Betzel, C. e Singh, T. P. Design of specific peptide inhibitors of phospholipase A2: structure of a complex formed between Russell's viper phospholipase A2 and a designed peptide Leu-Ala-IIe-Tyr-Ser (LAIYS). Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, v.58, n.Pt 10 Pt 2, Oct, p.1813-9. 2002b.

Cherry, J. K. The treatment of onchocerciasis. East Afr Med J, v.37, Aug, p.550-8. 1960.

Cheson, B. D., Levine, A. M., Mildvan, D., Kaplan, L. D., Wolfe, P., Rios, A., Groopman, J. E., Gill, P., Volberding, P. A., Poiesz, B. J. Suramin therapy in AIDS and related disorders. Report of the US Suramin Working Group. Jama, v.258, n.10, Sep 11, p.1347-51. 1987.

Chioato, L. Investigação das bases estruturais das atividades de bothropstoxina-I, uma fosfolipase A2-Lis49 isolada do veneno de *Bothrops jararacussu* e da fosfolipase A2 secretada humana do grupo IIA. (Tese de Doutorado). Departamento de Bioquímica e Imunologia, FMRP-USP, Ribeirão Preto-SP, 2004.

Church, W. B., Inglis, A. S., Tseng, A., Duell, R., Lei, P. W., Bryant, K. J. e Scott, K. F. A novel approach to the design of inhibitors of human secreted phospholipase A2 based on native peptide inhibition. J Biol Chem, v.276, n.35, Aug 31, p.33156-64. 2001.

Côrte-Real, M., F. Sansonetty, Ludovico, P., Prudêncio, C., Rodrigues, F., Fortuna, M., Sousa, M., Silva, M. e And Leão, C. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras, v.71. 2002. 19-33 p. (Boletim de Biotecnologia)

Crowl, R. M., Stoller, T. J., Conroy, R. R. e Stoner, C. R. Induction of phospholipase A2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. J Biol Chem, v.266, n.4, Feb 5, p.2647-51. 1991.

Cunningham, B. C. e Wells, J. A. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. Science, v.244, n.4908, Jun 2, p.1081-5. 1989.

Darden, T., York, D. e Pedersen, A. L. Particle mesh Ewald. An Nlog(N) method for Ewald sumsin large systems. J. Chem. Phys, v.98, p.10089–10092. 1993.

De Oliveira, A. H., Giglio, J. R., Andriao-Escarso, S. H., Ito, A. S. e Ward, R. J. A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A2 abolishes Ca2+-independent membrane damaging activity. Biochemistry, v.40, n.23, Jun 12, p.6912-20. 2001.

De Oliveira, M., Cavalcante, W. L., Arruda, E. Z., Melo, P. A., Dal-Pai Silva, M. e Gallacci, M. Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. Toxicon, v.42, n.4, Sep 15, p.373-9. 2003.

Deepa, M. e Veerabasappa Gowda, T. Purification and characterization of a glycoprotein inhibitor of toxic phospholipase from Withania somnifera. Arch Biochem Biophys, v.408, n.1, Dec 1, p.42-50. 2002.

Delehanty, J. B., Johnson, B. J., Hickey, T. E., Pons, T. e Ligler, F. S. Binding and neutralization of lipopolysaccharides by plant proanthocyanidins. J Nat Prod, v.70, n.11, Nov, p.1718-24. 2007.

Den Hertog, A., Van Den Akker, J. e Nelemans, A. Suramin and the inhibitory junction potential in taenia caeci of the guinea-pig. Eur J Pharmacol, v.173, n.2-3, Dec 7, p.207-9. 1989.

Dillard, R. D., Bach, N. J., Draheim, S. E., Berry, D. R., Carlson, D. G., Chirgadze, N. Y., Clawson, D. K., Hartley, L. W., Johnson, L. M., Jones, N. D., Mckinney, E. R., Mihelich, E. D., Olkowski, J. L., Schevitz, R. W., Smith, A. C., Snyder, D. W., Sommers, C. D. e Wery, J. P. Indole inhibitors of human nonpancreatic secretory phospholipase A2. 2. Indole-3-acetamides with additional functionality. J Med Chem, v.39, n.26, Dec 20, p.5137-58. 1996.

Doležel, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. Journal of Applied Genetics, v.38 n.3, p.285-302. 1997.

Draheim, S. E., Bach, N. J., Dillard, R. D., Berry, D. R., Carlson, D. G., Chirgadze, N. Y., Clawson, D. K., Hartley, L. W., Johnson, L. M., Jones, N. D., Mckinney, E. R., Mihelich, E. D., Olkowski, J. L., Schevitz, R. W., Smith, A. C., Snyder, D. W., Sommers, C. D. e Wery, J. P. Indole inhibitors of human nonpancreatic secretory phospholipase A2. 3. Indole-3-glyoxamides. J Med Chem, v.39, n.26, Dec 20, p.5159-75. 1996.

Dreicer, R., Smith, D. C., Williams, R. D. e See, W. A. Phase II trial of suramin in patients with metastatic renal cell carcinoma. Invest New Drugs, v.17, n.2, p.183-6. 1999.

Dua, R. e Cho, W. Inhibition of human secretory class II phospholipase A2 by heparin. Eur J Biochem, v.221, n.1, Apr 1, p.481-90. 1994.

Edwards, S. H., Thompson, D., Baker, S. F., Wood, S. P. e Wilton, D. C. The crystal structure of the H48Q active site mutant of human group IIA secreted phospholipase A2 at 1.5 A resolution provides an insight into the catalytic mechanism. Biochemistry, v.41, n.52, Dec 31, p.15468-76. 2002.

Eisenberger, M. A., Reyno, L. M., Jodrell, D. I., Sinibaldi, V. J., Tkaczuk, K. H., Sridhara, R., Zuhowski, E. G., Lowitt, M. H., Jacobs, S. C. e Egorin, M. J. Suramin, an active drug for prostate cancer: interim observations in a phase I trial. J Natl Cancer Inst, v.85, n.8, Apr 21, p.611-21. 1993.

Elsbach, P., Weiss, J. e Levy, O. Integration of antimicrobial host defenses: role of the bactericidal/permeability-increasing protein. Trends Microbiol, v.2, n.9, Sep, p.324-8. 1994.

Faure, G. Natural inhibitors of toxic phospholipases A(2). Biochimie, v.82, n.9-10, Sep-Oct, p.833-40. 2000.

Fleck, S. L., Birdsall, B., Babon, J., Dluzewski, A. R., Martin, S. R., Morgan, W. D., Angov, E., Kettleborough, C. A., Feeney, J., Blackman, M. J. e Holder, A. A. Suramin and suramin analogues inhibit merozoite surface protein-1 secondary processing and erythrocyte invasion by the malaria parasite Plasmodium falciparum. J Biol Chem, v.278, n.48, Nov 28, p.47670-7. 2003.

Fonteh, A. N., Marion, C. R., Barham, B. J., Edens, M. B., Atsumi, G., Samet, J. M., High, K. P. e Chilton, F. H. Enhancement of mast cell survival: a novel function of some secretory phospholipase A(2) isotypes. J Immunol, v.167, n.8, Oct 15, p.4161-71. 2001.

Freissmuth, M., Boehm, S., Beindl, W., Nickel, P., Ijzerman, A. P., Hohenegger, M. e Nanoff, C. Suramin analogues as subtype-selective G protein inhibitors. Mol Pharmacol, v.49, n.4, Apr, p.602-11. 1996.

Freissmuth, M., Waldhoer, M., Bofill-Cardona, E. e Nanoff, C. G protein antagonists. Trends Pharmacol Sci, v.20, n.6, Jun, p.237-45. 1999.

Funayama, Y., Nishio, K., Takeda, Y., Kubota, N., Ohira, T., Ohmori, T., Ohta, S., Ogasawara, H., Hasegawa, S. e Saijo, N. Suramin inhibits the phosphorylation and catalytic activity of DNA topoisomerase II in human lung cancer cells. Anticancer Res, v.13, n.6A, Nov-Dec, p.1981-8. 1993.

Funk, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. Science, v.294, n.5548, Nov 30, p.1871-5. 2001.

Gant, V. A., Warnes, G., Phillips, I. e Savidge, G. F. The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. J Med Microbiol, v.39, n.2, Aug, p.147-54. 1993.

Gelb, M. H., Jain, M. K., Hanel, A. M. e Berg, O. G. Interfacial enzymology of glycerolipid hydrolases: lessons from secreted phospholipases A2. Annu Rev Biochem, v.64, p.653-88. 1995.

Giuliani, C. D., Iemma, M. R., Bondioli, A. C., Souza, D. H., Ferreira, L. L., Amaral, A. C., Salvini, T. F. e Selistre-De-Araujo, H. S. Expression of an active recombinant lysine 49 phospholipase A(2) myotoxin as a fusion protein in bacteria. Toxicon, v.39, n.10, Oct, p.1595-600. 2001.

Gore, M. G. Spectrofotometry & Spectrofluorimetry 1998. 345 p. (Ed. Pratical Approach)

Gradishar, W. J., Soff, G., Liu, J., Cisneros, A., French, S., Rademaker, A., Benson, A. B., 3rd e Bouck, N. A pilot trial of suramin in metastatic breast cancer to assess antiangiogenic activity in individual patients. Oncology, v.58, n.4, May, p.324-33. 2000.

Griffith, O. W. e Stuehr, D. J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. Annu Rev Physiol, v.57, p.707-36. 1995.

Henning, R. H., Nelemans, A., Scaf, A. H., Van Eekeren, J., Agoston, S. e Den Hertog, A. Suramin reverses non-depolarizing neuromuscular blockade in rat diaphragm. Eur J Pharmacol, v.216, n.1, May 27, p.73-9. 1992.

Hess, B., H. Becker, Berendsen, H. J. e Fraaije, A. J. G. E. M. Lincs: a linear constraint solver for molecular simulations. J. Comp. Chem, v.18, p.1463-1472. 1997.

Hockney, R. W. e Goel, S. P. Quiet high-resolution computer models of a plasma. J. Comp. Phys, v.14, p.148-158. 1974.

Hosang, M. Suramin binds to platelet-derived growth factor and inhibits its biological activity. J Cell Biochem, v.29, n.3, p.265-73. 1985.

Huang, S. S. e Huang, J. S. Rapid turnover of the platelet-derived growth factor receptor in sis-transformed cells and reversal by suramin. Implications for the mechanism of autocrine transformation. J Biol Chem, v.263, n.25, Sep 5, p.12608-18. 1988.

Humphreys, M. J., Allman, R. e Lloyd, D. Determination of the viability of Trichomonas vaginalis using flow cytometry. Cytometry, v.15, n.4, Apr 1, p.343-8. 1994.

Inada, M., Tojo, H., Kawata, S., Tarui, S. e Okamoto, M. Preferential distribution of group-II-like phospholipase A2 in mononuclear phagocytic cells in rat spleen and liver. Eur J Biochem, v.197, n.2, Apr 23, p.323-9. 1991.

Jabeen, T., Singh, N., Singh, R. K., Sharma, S., Somvanshi, R. K., Dey, S. e Singh, T. P. Non-steroidal antiinflammatory drugs as potent inhibitors of phospholipase A2: structure of the complex of phospholipase A2 with niflumic acid at 2.5 Angstroms resolution. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, v.61, n.Pt 12, Dec, p.1579-86. 2005.

Jancar, S. e Sanchez Crespo, M. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm. Trends Immunol, v.26, n.1, Jan, p.48-55. 2005.

Jindal, H. K., Anderson, C. W., Davis, R. G. e Vishwanatha, J. K. Suramin affects DNA synthesis in HeLa cells by inhibition of DNA polymerases. Cancer Res, v.50, n.24, Dec 15, p.7754-7. 1990.

Johnson, B. J., Delehanty, J. B., Lin, B. e Ligler, F. S. Immobilized proanthocyanidins for the capture of bacterial lipopolysaccharides. Anal Chem, v.80, n.6, Mar 15, p.2113-7. 2008.

Kelley, M. J., Crowl, R. M. e Dennis, E. A. Renaturation of cobra venom phospholipase A2 expressed from a synthetic gene in Escherichia coli. Biochim Biophys Acta, v.1118, n.2, Jan 9, p.107-15. 1992.

Kihara, H. Studies on phospholipase A in Trimeresurus flaoviridis venom. III. Purification and some properties of phospholipase A inhibitor in Habu serum. J Biochem, v.80, n.2, Aug, p.341-9. 1976.

Koduri, R. S., Gronroos, J. O., Laine, V. J., Le Calvez, C., Lambeau, G., Nevalainen, T. J. e Gelb, M. H. Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A(2). J Biol Chem, v.277, n.8, Feb 22, p.5849-57. 2002.

Kramer, R. M., Hession, C., Johansen, B., Hayes, G., Mcgray, P., Chow, E. P., Tizard, R. e Pepinsky, R. B. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2. J Biol Chem, v.264, n.10, Apr 5, p.5768-75. 1989.

Kudo, I. e Murakami, M. Phospholipase A2 enzymes. Prostaglandins Other Lipid Mediat, v.68-69, Aug, p.3-58. 2002.

Kuo, K. W., Chen, Y. C. e Chang, C. C. cDNA sequence analysis and expression of alpha-bungarotoxin from Taiwan banded krait (Bungarus multicinctus). Biochem Biophys Res Commun, v.216, n.3, Nov 22, p.1088-94. 1995.

Laine, V. J., Grass, D. S. e Nevalainen, T. J. Protection by group II phospholipase A2 against Staphylococcus aureus. J Immunol, v.162, n.12, Jun 15, p.7402-8. 1999.

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

Lane, T. E., Wu-Hsieh, B. A. e Howard, D. H. Gamma interferon cooperates with lipopolysaccharide to activate mouse splenic macrophages to an antihistoplasma state. Infect Immun, v.61, n.4, Apr, p.1468-73. 1993.

Larocca, R. V., Cooper, M. R., Uhrich, M., Danesi, R., Walther, M. M., Linehan, W. M. e Myers, C. E. Use of suramin in treatment of prostatic carcinoma refractory to conventional hormonal manipulation. Urol Clin North Am, v.18, n.1, Feb, p.123-9. 1991.

Lattig, J., Bohl, M., Fischer, P., Tischer, S., Tietbohl, C., Menschikowski, M., Gutzeit, H. O., Metz, P. e Pisabarro, M. T. Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A2 by flavonoids: rationale for lead design. J Comput Aided Mol Des, v.21, n.8, Aug, p.473-83. 2007.

Lebaron, P., Catala, P. e Parthuisot, N. Effectiveness of SYTOX Green stain for bacterial viability assessment. Appl Environ Microbiol, v.64, n.7, Jul, p.2697-700. 1998.

Lefkowitz, L. J., Deems, R. A. e Dennis, E. A. Expression of group IA phospholipase A2 in Pichia pastoris: identification of a phosphatidylcholine activator site using site-directed mutagenesis. Biochemistry, v.38, n.43, Oct 26, p.14174-84. 1999.

Levy, O., Ooi, C. E., Weiss, J., Lehrer, R. I. e Elsbach, P. Individual and synergistic effects of rabbit granulocyte proteins on Escherichia coli. J Clin Invest, v.94, n.2, Aug, p.672-82. 1994.

Liang, N. S., Pungercar, J., Krizaj, I., Strukelj, B. e Gubensek, F. Expression of fully active ammodytoxin A, a potent presynaptically neurotoxic phospholipase A2, in Escherichia coli. FEBS Lett, v.334, n.1, Nov 8, p.55-9. 1993.

Lin-Shiau, S. Y. e Lin, M. J. Suramin inhibits the toxic effects of presynaptic neurotoxins at the mouse motor nerve terminals. Eur J Pharmacol, v.382, n.2, Oct 8, p.75-80. 1999.

Lindahl E., Hess, B. e Spoel, A. D. V. D. Gromacs 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. J. Mol. Mod, v.7, p.306-317. 2001.

Lindahl, M. e Tagesson, C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. Inflammation, v.21, n.3, Jun, p.347-56. 1997.

Liu, X., Pan, H., Yang, G., Wu, X. e Zhou, Y. Cloning, expression and biochemical characterization of a basicacidic hybrid phospholipase A2-II from Agkistrodon halys pallas. Biochim Biophys Acta, v.1431, n.1, Apr 12, p.157-65. 1999.

Lizano, S., Domont, G. e Perales, J. Natural phospholipase A(2) myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. Toxicon, v.42, n.8, Dec 15, p.963-77. 2003.

Lomonte, B., Lundgren, J., Johansson, B. e Bagge, U. The dynamics of local tissue damage induced by Bothrops asper snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. Toxicon, v.32, n.1, Jan, p.41-55. 1994a.

Lomonte, B., Moreno, E., Tarkowski, A., Hanson, L. A. e Maccarana, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A2 from Bothrops asper snake venom. J. Biol. Chem., v.269, p.29867-29873. 1994b.

Lorsbach, R. B., Murphy, W. J., Lowenstein, C. J., Snyder, S. H. e Russell, S. W. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. J Biol Chem, v.268, n.3, Jan 25, p.1908-13. 1993.

Luster, A. D. e Tager, A. M. T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way. Nat Rev Immunol, v.4, n.9, Sep, p.711-24. 2004.

Macmicking, J., Xie, Q. W. e Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol, v.15, p.323-50. 1997.

Melo, P. A., Homsi-Brandeburgo, M. I., Giglio, J. R. e Suarez-Kurtz, G. Antagonism of the myotoxic effects of Bothrops jararacussu venom and bothropstoxin by polyanions. Toxicon, v.31, n.3, Mar, p.285-91. 1993.

Melo, P. A. e Suarez-Kurtz, G. Release of creatine kinase from skeletal muscles by Bothrops venoms: heparin potentiation of inhibition by antivenin. Braz J Med Biol Res, v.21, n.3, p.545-8. 1988.

Mihelich, E. D. e Schevitz, R. W. Structure-based design of a new class of anti-inflammatory drugs: secretory phospholipase A(2) inhibitors, SPI. Biochim Biophys Acta, v.1441, n.2-3, Nov 23, p.223-8. 1999.

Mishra, L. C., Singh, B. B. e Dagenais, S. Scientific basis for the therapeutic use of Withania somnifera (ashwagandha): a review. Altern Med Rev, v.5, n.4, Aug, p.334-46. 2000.

Miyamoto, S. e Kollman, P. A. SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. J. Comp. Chem, v.13, p.952–962. 1992.

Moore, R. A., Bates, N. C. e Hancock, R. E. Interaction of polycationic antibiotics with Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymyxin. Antimicrob Agents Chemother, v.29, n.3, Mar, p.496-500. 1986.

Mortimer, F. C., Mason, D. J. e Gant, V. A. Flow cytometric monitoring of antibiotic-induced injury in Escherichia coli using cell-impermeant fluorescent probes. Antimicrob Agents Chemother, v.44, n.3, Mar, p.676-81. 2000.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, v.65, n.1-2, Dec 16, p.55-63. 1983.

Murakami, M., Kudo, I., Suwa, Y. e Inoue, K. Release of 14-kDa group-II phospholipase A2 from activated mast cells and its possible involvement in the regulation of the degranulation process. Eur J Biochem, v.209, n.1, Oct 1, p.257-65. 1992.

Murakami, M. T., Arruda, E. Z., Melo, P. A., Martinez, A. B., Calil-Elias, S., Tomaz, M. A., Lomonte, B., Gutierrez, J. M. e Arni, R. K. Inhibition of myotoxic activity of Bothrops asper myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. J Mol Biol, v.350, n.3, Jul 15, p.416-26. 2005.

Murakami, M. T., Gava, L. M., Zela, S. P., Arruda, E. Z., Melo, P. A., Gutierrez, J. M. e Arni, R. K. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of suramin, a highly charged polysulfonated napthylurea, complexed with a myotoxic PLA2 from Bothrops asper venom. Biochim Biophys Acta, v.1703, n.1, Dec 1, p.83-5. 2004.

Nakazawa, K., Inoue, K., Fujimori, K. e Takanaka, A. Effects of ATP antagonists on purinoceptor-operated inward currents in rat phaeochromocytoma cells. Pflugers Arch, v.418, n.3, Apr, p.214-9. 1991.

Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. Faseb J, v.6, n.12, Sep, p.3051-64. 1992.

Nelson, R. M. e Long, G. L. A general method of site-specific mutagenesis using a modification of the Thermus aquaticus polymerase chain reaction. Anal Biochem, v.180, n.1, Jul, p.147-51. 1989.

Nevalainen, T. J., Aho, H. J. e Peuravuori, H. Secretion of group 2 phospholipase A2 by lacrimal glands. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.35, n.2, Feb, p.417-21. 1994.

Nevalainen, T. J. e Haapanen, T. J. Distribution of pancreatic (group I) and synovial-type (group II) phospholipases A2 in human tissues. Inflammation, v.17, n.4, Aug, p.453-64. 1993.

Nicolas, J. P., Lambeau, G. e Lazdunski, M. Identification of the binding domain for secretory phospholipases A2 on their M-type 180-kDa membrane receptor. J Biol Chem, v.270, n.48, Dec 1, p.28869-73. 1995.

Ohkura, N., Okuhara, H., Inoue, S., Ikeda, K. e Hayashi, K. Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A2 inhibitors from the blood plasma of the Chinese mamushi, Agkistrodon blomhoffii siniticus. Biochem J, v.325 (Pt 2), Jul 15, p.527-31. 1997.

Oslund, R. C., Cermak, N. e Gelb, M. H. Highly specific and broadly potent inhibitors of mammalian secreted phospholipases A2. J Med Chem, v.51, n.15, Aug 14, p.4708-14. 2008.

Othman, R., Baker, S., Li, Y., Worrall, A. F. e Wilton, D. C. Human non-pancreatic (group II) secreted phospholipase A2 expressed from a synthetic gene in Escherichia coli: characterisation of N-terminal mutants. Biochim Biophys Acta, v.1303, n.2, Sep 27, p.92-102. 1996.

Páramo, L., Lomonte, B., Pizarro-Cerdá, J., Bengoechea, J. A., Gorvel, J. P. e Moreno, P. Bactericidal activity of Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipase A2 from Bothrops asper snake venom: synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. Eur. J. Biochem., v.253, n.2, p.452-461. 1998.

Pentland, A. P., Morrison, A. R., Jacobs, S. C., Hruza, L. L., Hebert, J. S. e Packer, L. Tocopherol analogs suppress arachidonic acid metabolism via phospholipase inhibition. J Biol Chem, v.267, n.22, Aug 5, p.15578-84. 1992.

Pieterson, W. A., Vidal, J. C., Volwerk, J. J. e De Haas, G. H. Zymogen-catalyzed hydrolysis of monomeric substrates and the presence of a recognition site for lipid-water interfaces in phospholipase A2. Biochemistry, v.13, n.7, p.1455-1460. 1974.

Qu, X. D., Lloyd, K. C., Walsh, J. H. e Lehrer, R. I. Secretion of type II phospholipase A2 and cryptdin by rat small intestinal Paneth cells. Infect Immun, v.64, n.12, Dec, p.5161-5. 1996.

Raffa, R. B. Harmonic mean relationship between affinity for wild-type receptors and alanine-scan mutants. J Theor Biol, v.218, n.2, Sep 21, p.207-14. 2002.

Ramirez, F. e Jain, M. K. Phospholipase A2 at the Bilayer Interface. Proteins: Structure, Function and Genetics, v.9, p.229-239. 1991.

Renetseder, R., Brunie, S., Dijkstra, B. W., Drenth, J. e Sigler, P. B. A comparison of the crystal structures of phospholipase A2 from bovine pancreas and Crotalus atrox venom. J. Biol. Chem., v.260, p.11627-11636. 1985.

Renetseder, R., Dijkstra, B. W., Huizinga, K., Kalk, K. H. e Drenth, J. Crystal structure of bovine pancreatic phospholipase A2 covalently inhibited by p-bromo-phenacyl-bromide. J Mol Biol, v.200, n.1, Mar 5, p.181-8. 1988.

Richieri, G. V. e Kleinfeld, A. M. Continuous measurement of phospholipase A2 activity using the fluorescent probe ADIFAB. Anal Biochem, v.229, n.2, Aug 10, p.256-63. 1995.

Richieri, G. V., Ogata, R. T. e Kleinfeld, A. M. A fluorescently labeled intestinal fatty acid binding protein. Interactions with fatty acids and its use in monitoring free fatty acids. J Biol Chem, v.267, n.33, Nov 25, p.23495-501. 1992.

Richieri, G. V., Ogata, R. T. e Kleinfeld, A. M. The measurement of free fatty acid concentration with the fluorescent probe ADIFAB: a practical guide for the use of the ADIFAB probe. Mol Cell Biochem, v.192, n.1-2, Feb, p.87-94. 1999.

Rifkin, D. B. e Moscatelli, D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. J Cell Biol, v.109, n.1, Jul, p.1-6. 1989.

Ripka, W. C., Sipio, W. J. e Galbraith, W. G. Molecular modeling in the design of phospholipase A2 inhibitors. J Cell Biochem, v.40, n.3, Jul, p.279-86. 1989.

Roth, B. L., Poot, M., Yue, S. T. e Millard, P. J. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. Appl Environ Microbiol, v.63, n.6, Jun, p.2421-31. 1997.

Rufini, S., Cesaroni, P., Desideri, A., Farias, R., Gubensek, F., Gutierrez, J. M., Luly, P., Massoud, R., Morero, R. e Pedersen, J. Z. Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. Biochemistry, v.31, n.49, Dec 15, p.12424-30. 1992.

Sawyer, J. S., Beight, D. W., Smith, E. C., Snyder, D. W., Chastain, M. K., Tielking, R. L., Hartley, L. W. e Carlson, D. G. Carbocyclic[g]indole inhibitors of human nonpancreatic s-PLA2. J Med Chem, v.48, n.3, Feb 10, p.893-6. 2005.

Schaloske, R. H. e Dennis, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. Biochim Biophys Acta, v.1761, n.11, Nov, p.1246-59. 2006.

Schneider, J. [Treatment of human African trypanosomiasis.]. Bull World Health Organ, v.28, p.763-86. 1963.

Scott, D. L., Otwinowski, Z., Gelb, M. H. e Sigler, P. B. Crystal structure of bee venom phospholipase A2 in a complex with a transition state analogue. Science, v.250 p.1563-1566. 1990a.

Scott, D. L., White, S. P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M. H. e Sigler, P. B. Interfacial Catalysis: The Mechanism of Phospholipase A2. Science, v.250, p.1541-1546. 1990b.

Scott, D. L., Achari, A., Vidal, J. C. e Sigler, P. B. Crystallographical and biochemical studies of the (inactive) Lys49 Phospholipase A2 from the venom of Agkistrodon piscivorus piscivorus. J. Biol. Chem., v.267, p.22645-22657. 1992.

Scott, D. L. e Sigler, P. B. Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A2. Adv. Protein Chem., v.45, p.53-58. 1994.

Seilhamer, J. J., Plant, S., Pruzanski, W., Schilling, J., Stefanski, E., Vadas, P. e Johnson, L. K. Multiple forms of phospholipase A2 in arthritic synovial fluid. J Biochem, v.106, n.1, Jul, p.38-42. 1989.

Shimomura, H., Matsuura, M., Saito, S., Hirai, Y., Isshiki, Y. e Kawahara, K. Unusual interaction of a lipopolysaccharide isolated from Burkholderia cepacia with polymyxin B. Infect Immun, v.71, n.9, Sep, p.5225-30. 2003.
Singer, A. G., Ghomashchi, F., Le Calvez, C., Bollinger, J., Bezzine, S., Rouault, M., Sadilek, M., Nguyen, E., Lazdunski, M., Lambeau, G. e Gelb, M. H. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. J Biol Chem, v.277, n.50, Dec 13, p.48535-49. 2002.

Singh, R. K., Ethayathulla, A. S., Jabeen, T., Sharma, S., Kaur, P. e Singh, T. P. Aspirin induces its antiinflammatory effects through its specific binding to phospholipase A2: crystal structure of the complex formed between phospholipase A2 and aspirin at 1.9 angstroms resolution. J Drug Target, v.13, n.2, Feb, p.113-9. 2005.

Singh, R. K., Vikram, P., Makker, J., Jabeen, T., Sharma, S., Dey, S., Kaur, P., Srinivasan, A. e Singh, T. P. Design of specific peptide inhibitors for group I phospholipase A2: structure of a complex formed between phospholipase A2 from Naja naja sagittifera (group I) and a designed peptide inhibitor Val-Ala-Phe-Arg-Ser (VAFRS) at 1.9 A resolution reveals unique features. Biochemistry, v.42, n.40, Oct 14, p.11701-6. 2003.

Snitko, Y., Koduri, R. S., Han, S. K., Othman, R., Baker, S. F., Molini, B. J., Wilton, D. C., Gelb, M. H. e Cho, W. Mapping the interfacial binding surface of human secretory group IIa phospholipase A2. Biochemistry, v.36, n.47, Nov 25, p.14325-33. 1997.

Studier, F. W. e Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol, v.189, n.1, May 5, p.113-30. 1986.

Suschek, C. V., Schnorr, O. e Kolb-Bachofen, V. The role of iNOS in chronic inflammatory processes in vivo: is it damage-promoting, protective, or active at all? Curr Mol Med, v.4, n.7, Nov, p.763-75. 2004.

Szoka, F., Jr. e Papahadjopoulos, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.75, n.9, Sep, p.4194-8. 1978.

Tan, G. T., Wickramasinghe, A., Verma, S., Singh, R., Hughes, S. H., Pezzuto, J. M., Baba, M. e Mohan, P. Potential anti-AIDS naphthalenesulfonic acid derivatives. Synthesis and inhibition of HIV-1 induced cytopathogenesis and HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptase activities. J Med Chem, v.35, n.26, Dec 25, p.4846-53. 1992.

Terenzi, F., Diaz-Guerra, M. J., Casado, M., Hortelano, S., Leoni, S. e Bosca, L. Bacterial lipopeptides induce nitric oxide synthase and promote apoptosis through nitric oxide-independent pathways in rat macrophages. J Biol Chem, v.270, n.11, Mar 17, p.6017-21. 1995.

Thannhauser, T. W., Konishi, Y. e Scheraga, H. A. Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins. Anal Biochem, v.138, n.1, Apr, p.181-8. 1984.

Thunnissen, M. M. G. M., Elso, A. B., Kalk, K. H., Drenth, J., Dijkastra, B. W., Kuipers, O. P., Dijkman, R., De Haas, G. H. e Verheij, H. M. X-ray structure of phospholipase A2 complexed with a substrate-derived inhibitor. Nature, v.347, p.689-691. 1990.

Tinoco, I., Mickols, W. e Jr, A. Absorption, scattering, and imaging of biomolecular structures with polarized light. Ann. Rev. Biophys. Chem, v.16, p.319-349. 1987.

Traber, M. G. e Packer, L. Vitamin E: beyond antioxidant function. Am J Clin Nutr, v.62, n.6 Suppl, Dec, p.1501S-1509S. 1995.

Triggiani, M., Granata, F., Balestrieri, B., Petraroli, A., Scalia, G., Del Vecchio, L. e Marone, G. Secretory phospholipases A2 activate selective functions in human eosinophils. J Immunol, v.170, n.6, Mar 15, p.3279-88. 2003.

Triggiani, M., Granata, F., Frattini, A. e Marone, G. Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A2. Biochim Biophys Acta, v.1761, n.11, Nov, p.1289-300. 2006.

Triggiani, M., Granata, F., Giannattasio, G. e Marone, G. Secretory phospholipases A2 in inflammatory and allergic diseases: not just enzymes. J Allergy Clin Immunol, v.116, n.5, Nov, p.1000-6. 2005.

Valentin, E. e Lambeau, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. Biochim Biophys Acta, v.1488, n.1-2, p.59-70. 2000.

Van Deenen, L. L. M. e De Haas, G. H. The substrate specificity of phospholipase A2. Biochem. Biophys. Acta, v.70, p.538-553. 1963.

Vansterkenburg, E. L., Coppens, I., Wilting, J., Bos, O. J., Fischer, M. J., Janssen, L. H. e Opperdoes, F. R. The uptake of the trypanocidal drug suramin in combination with low-density lipoproteins by Trypanosoma brucei and its possible mode of action. Acta Trop, v.54, n.3-4, Sep, p.237-50. 1993.

Verheij, H. M., Slotboom, A. J. e De Haas, G. H. Structure and function of phospholipase A2. Rev Physiol Biochem Pharmacol, v.91, p.91-203. 1981.

Ward, R. J., De Oliveira, A. H., Bortoleto, R. K., Rosa, J. C., Faca, V. M. e Greene, L. J. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys49-phospholipase A2 homologue, expressed as inclusion bodies in Escherichia coli. Protein Expr Purif, v.21, n.1, Feb, p.134-40. 2001.

Weinrauch, Y., Elsbach, P., Madsen, L. M., Foreman, A. e Weiss, J. The potent anti-Staphylococcus aureus activity of a sterile rabbit inflammatory fluid is due to a 14-kD phospholipase A2. J Clin Invest, v.97, n.1, Jan 1, p.250-7. 1996.

Weiss, J., Inada, M., Elsbach, P. e Crowl, R. M. Structural determinants of the action against Escherichia coli of a human inflammatory fluid phospholipase A2 in concert with polymorphonuclear leukocytes. J Biol Chem, v.269, n.42, Oct 21, p.26331-7. 1994.

Wright, G. C., Weiss, J., Kim, K. S., Verheij, H. e Elsbach, P. Bacterial phospholipid hydrolysis enhances the destruction of Escherichia coli ingested by rabbit neutrophils. Role of cellular and extracellular phospholipases. J Clin Invest, v.85, n.6, Jun, p.1925-35. 1990.

Yang, W. L., Peng, L. S., Zhong, X. F., Wei, J. W., Jiang, X. Y., Ye, L. T., Zou, L., Tu, H. B., Wu, W. Y. e Xu, A. L. Functional expression and characterization of a recombinant phospholipase A2 from sea snake Lapemis hardwickii as a soluble protein in E. coli. Toxicon, v.41, n.6, May, p.713-21. 2003.

Zhao, K., Song, S., Lin, Z. e Zhou, Y. Structure of a basic phospholipase A2 from Agkistrodon halys Pallas at 2.13 A resolution. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, v.54 (Pt 4), Jul 1, p.510-21. 1998.

Zhu, X. B., Tang, S. B., Luo, Y. e Huang, X. K. [The inhibiting effects of suramin on bFGF induced proliferation of cultured human RPE cells.]. Zhonghua Yan Ke Za Zhi, v.41, n.2, Feb, p.110-3. 2005.