UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Isolamento, caracterização estrutural e bioquímica de uma nova fosfolipase A₂ presente na peçonha de *Lachesis muta rhombeata*”

Francielle Almeida Cordeiro

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Isolamento, caracterização estrutural e bioquímica de uma nova fosfolipase A₂ presente na peçonha de *Lachesis muta rhombeata*”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Francielle Almeida Cordeiro

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Candiani Arantes Braga

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 08/05/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Cordeiro, Francielle Almeida

Isolamento, caracterização estrutural e bioquímica de uma nova fosfolipase A₂ presente na peçonha de *Lachesis muta rhombeata*. Ribeirão Preto, 2013. 112p: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga

1. *Lachesis muta*. 2. Fosfolipase A₂. 3. Peçonha de serpente

Observação: A foto utilizada na capa deste trabalho é de autoria da Profa. Dra. Eliane C. Arantes Braga.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Francielle Almeida Cordeiro

“Isolamento, caracterização estrutural e bioquímica de uma nova fosfolipase A₂ presente na peçonha de *Lachesis muta rhombeata*”.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Candiani Arantes Braga

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Assinatura** _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Assinatura** _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Assinatura** _____

**Este trabalho é dedicado acima de tudo a Deus e à minha família
por estar sempre presente.**

Agradecimentos

Foram tantas pessoas que me ajudaram, dividiram comigo cada experimento, discussão, enfim, sinto que essa dissertação é um pouco de cada um desses nomes que vou citar.

Primeiro gostaria de agradecer minha família, meus pais, meus irmãos, cunhados, sobrinhos, enfim, sempre me apoiaram, aconselharam nos momentos difíceis e nas alegrias durante esse período. Principalmente à minha mãe por me inspirar sempre; meu pai por seus conselhos carinhosos e meu irmão, Ricardo, que fez a capa do trabalho!

Também gostaria de agradecer todos os meus amigos que fizeram parte da minha vida durante todo esse tempo. Amigos de perto e de longe, sem citar nomes, vocês sabem quem são. Agradeço a Deus pela vida de cada um de vocês.

Agradeço a Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes por ter me recebido de braços abertos no Laboratório de Toxinas Animais, por ter acreditado no meu trabalho e me ensinado tanto. Por ter vibrado a cada bom resultado e ter me incentivado a buscar sempre o melhor.

Ao amigo Tibério Perini por ter sido meu parceiro neste trabalho, pelas cromatografias, plaquinhas de hemólise, horas e horas de ensaio cinético, discussões, amizade, trocas de aprendizado, os brigadeiros. Você é uma pessoa muito querida e competente, merece todo sucesso!!!

A Cristiane Bregge pela "herança laquéica". Pelos primeiros ensinamentos do laboratório, pelas conversas, e por tudo que me permitiu aprender com esse trabalho. Você tem o dom do ensino Bregge, está no caminho certo! Muito obrigada por tudo!

A Karlinha por ser tão fundamental dentro do LTA, não apenas como técnica, mas pelos seus conselhos sempre na hora certa e por suas observações que fazem toda a diferença! A sua experiência e habilidade ajudaram muito no meu trabalho, obrigada!! E também a Iara por todo auxílio técnico, paciência e amizade!

Ao "clã do F" – Fernanda, Fernando, Johara, Renata, Ernesto e agregados... "Há amigo mais chegado que irmão", vocês são mais que amigos, são irmãos, amo vocês! Levo pra todo o resto da minha vida com toda certeza!!

Aos amigos do LTA – Pri Carmanham, Pri Shibao, Amanda, Gisele, Mateus, Elisa, Felipe, Manu, Carol Marroni muito obrigada pelo companheirismo e aprendizado do dia-a-dia! Carol, muito obrigada pelo auxílio no final do trabalho!

Ao professor Cesar Rosa pela contribuição com o sequenciamento e pelos ensinamentos em espectrometria de massas;

Ao professor Wagner dos Santos por ter me recebido em seu laboratório, ter dedicado um pouco do seu tempo para me ensinar, contribuir com idéias e discussão, muito obrigada!

A professora Veridiana Rodrigues por ter me recebido em seu Laboratório em Uberlândia. Ao David e a Dayane por terem dedicado um pouco de seu tempo nesse trabalho! Muito obrigada a todo pessoal de Uberlândia pelos momentos agradáveis e produtivos que tive aí!

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - funcionários, professores de disciplinas, colegas de pós-graduação!

A CAPES pelo auxílio financeiro

RESUMO

Cordeiro, F. A. **Isolamento, caracterização estrutural e bioquímica de uma nova fosfolipase A₂ presente na peçonha de *Lachesis muta rhombeata***. 112f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP, 2013.

As serpentes contêm em sua peçonha inúmeras substâncias que vão desde componentes inorgânicos até proteínas complexas com diferentes atividades sobre diversos sistemas fisiológicos. As serpentes do gênero *Lachesis* estão distribuídas na floresta tropical da América Central e do Sul, incluindo o Brasil. Entre as substâncias encontradas na peçonha dessas serpentes estão as fosfolipases A₂ (PLA₂), que constituem uma família de enzimas que catalisam a hidrólise da ligação éster sn-2 em glicerofosfolipídeos e exibem uma variedade de atividades fisiológicas e patológicas, incluindo neurotoxicidade pré e pós-sináptica. Elas induzem a formação de edema, afetam a agregação plaquetária, além de serem potentes promotores de inflamação. Os objetivos desse trabalho foram o isolamento, a caracterização estrutural e bioquímica de uma nova PLA₂ presente na peçonha de *Lachesis muta*. A peçonha foi submetida a uma filtração em gel em coluna *HiPrep Sephacryl S200*, obtendo-se as frações LmS-A a LmS-K. As frações LmS-G, LmS-H e LmS-I apresentaram elevada atividade fosfolipásica, com destaque para a fração LmS-G, que foi então submetida a uma cromatografia de fase reversa, obtendo-se um pico majoritário denominado Lmr-PLA₂. A sequência de aminoácidos da Lmr-PLA₂ apresentou alta identidade com PLA₂s já descritas na literatura, porém, com alguns resíduos distintos, caracterizando-a como uma nova PLA₂. Além disso, a enzima possui o resíduo D49 na sua sequência de aminoácidos, sugerindo ser uma PLA₂ cataliticamente ativa, confirmado pelo ensaio de atividade hemolítica indireta. A massa molar determinada por espectrometria de massas foi de 13,9 kDa. Através de eletroforese bidimensional, foi determinado o ponto isoeletrico de 5,49, indicando ser uma PLA₂ ácida. Os parâmetros cinéticos obtidos foram velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis (K_m) de 1,147 nmol/min/mL e 0,404 mM além de $K_{cat} = 0,41 \text{ min}^{-1}$, ou número de *turnover*, e a eficiência catalítica $K_{cat}/K_m = 1,02 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ sobre o substrato NOB (3-(*octanoyloxy*)benzoic acid). A Lmr-PLA₂ inibe a agregação plaquetária, é edematogênica, mas não é miotóxica. Os níveis plasmáticos de creatina cinase, proteínas, ureia e γ -glutamyltranspeptidase de camundongos que receberam injeção de Lmr-PLA₂ não foram alterados. Estes dados juntamente com as análises de miotoxidade demonstraram que a enzima tem baixa toxicidade *in vivo*. A elevada atividade catalítica e baixa toxicidade da Lmr-PLA₂ tornam esta molécula promissora para o desenvolvimento de fármacos.

Palavras-chave: Peçonha de serpente, *Lachesis muta rhombeata*, fosfolipase A₂, edema.

ABSTRACT

Cordeiro, F.A. **Isolation, structural and biochemical characterization of a new phospholipase A₂ from *Lachesis muta rhombeata* venom.** 112f. Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Snakes contain numerous substances in their venom ranging from inorganic to complex proteins with different activities on various physiological systems. Snakes of the genus *Lachesis* are distributed in the rainforest of Central and South America, including Brazil. Among the substances found in the venom of these snakes are phospholipases A₂ (PLA₂), which constitute a family of enzymes that catalyze the hydrolysis of the sn-2 ester bond in glycerophospholipids and exhibit a variety of physiological and pathological activities, including neurotoxicity pre- and post-synaptic. They induce the formation of edema, affect platelet aggregation and are potent promoters of inflammation. The objectives of this work are the isolation, structural and biochemical characterization of a new PLA₂ present in the venom of *Lachesis muta rhombeata*. The role venom was subjected to gel filtration in *Sephacryl S200*, obtaining fractions LMS-A to LMS-K. The fractions LMS-G, LMS-H and LMS-I exhibited phospholipase activity, particularly the fraction LMS-G, which was then subjected to reversed phase chromatography, yielding a majority peak called Lmr-PLA₂. The amino acid sequence of Lmr-PLA₂ showed high identity with PLA₂s already described in the literature, but with some distinct residues, characterizing it as a new PLA₂. Additionally, this enzyme possesses the residue D49 in its amino acid sequence, indicating that one catalytically active PLA₂ confirmed by indirect hemolytic activity. The molar mass determined by mass spectrometry was 13.9 kDa and its isoelectric point 5.49, indicating that Lm-PLA₂ is an acid phospholipase. The kinetic parameters were $V_{max} = 1.147$ nmol/min/mL and $K_m = 0.404$ mM; $K_{cat} = 0.41$ min⁻¹, or *turnover* number, e a catalytic efficiency, $K_{cat}/K_m = 1.02$ mM⁻¹min⁻¹ with NOB (3-(*octanoyloxy*)benzoic acid) substrate. Lmr-PLA₂ inhibits platelet aggregation, causes edema, but it is not myotoxic. Plasma levels of creatine kinase, protein, urea and γ -glutamyltranspeptidase of mice injected with Lmr-PLA₂ have not changed. These data together with myotoxicity analysis showed that the enzyme has low toxicity *in vivo*. The high catalytic activity and low toxicity of Lmr-PLA₂ make this molecule promising for drug development.

Keywords: Snake venom, *Lachesis muta rhombeata*, phospholipases A₂, edema.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação entre os casos de acidentes ofídicos e as regiões do Brasil.....	3
Figura 2. Serpente <i>Lachesis muta rhombeata</i>	5
Figura 3. Posição de hidrólise das fosfolipases	8
Figura 4. Estrutura cristalográfica de PLA ₂ s do grupo I.....	11
Figura 5. Estrutura cristalográfica de PLA ₂ s do grupo II.....	12
Figura 6. Perfil cromatográfico de 20 mg de peçonha bruta de <i>Lachesis muta rhombeata</i> em <i>HiPrep Sephacryl S-200 HR</i>	30
Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS das frações obtidas na exclusão molecular em <i>Sephacryl</i>	32
Figura 8A e B. Atividade fosfolipásica pelo teste de hemólise radial indireta, das frações obtidas por filtração em gel da peçonha de <i>L. muta</i> em coluna <i>Sephacryl S200</i>	33
Figura 9. Perfil de eluição da fração LmS-G da peçonha de <i>Lachesis muta rhombeata</i> em coluna de fase reversa C18	35
Figura 10. Atividade fosfolipásica, determinada pelo teste de hemólise radial indireta, da fração Lmr-PLA ₂ , obtida por CLAE-C18 da fração LmS-G.....	36
Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS da fração Lmr-PLA ₂ da C18	39
Figura 12. Curva de calibração para estimativa da massa molar da PLA ₂ purificada em fase reversa.....	40
Figura 13. Espectrometria de massas da fração Lmr-PLA ₂	41
Figura 14. Sequência amino-terminal inicial da Lmr-PLA ₂	42
Figura 15. <i>Peptide mass fingerprinting</i> da Lmr-PLA ₂ em <i>Electrospray</i> triplo-quadrupolo, ESI+-Q-TOF-MS.....	43
Figura 16. Espectro de fragmentação MS/MS referente ao pico de m/z 427 do <i>peptide mass fingerprinting</i>	44
Figura 17. Sequência da Lmr-PLA ₂ obtida por degradação de Edman e espectrometria de massas.....	45
Figura 18. Alinhamento da sequência em aminoácidos da Lmr-PLA ₂ com as PLA ₂ s caracterizadas por Jimenez et al. (2009), De Assis et al. (2008) e Fuly et al. (2000; 2002) e Damico et al. (2005; 2012).....	46
Figura 19. Alinhamento da sequência em aminoácidos da Lmr-PLA ₂ com a PLA ₂ da serpente <i>Gloydius halys</i>	49

Figura 20. Estrutura da PLA ₂ da serpente <i>Gloydius halys</i>	50
Figura 21. Focalização isoeletrica da Lmr-PLA ₂ em gel bidimensional.....	51
Figura 22. Substrato NOB.....	53
Figura 23. Efeito da concentração do substrato na velocidade de uma reação catalisada pela Lmr-PLA ₂	54
Figura 24. Efeito sobre plaquetas das PLA ₂ s de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e Lmr-PLA ₂	57
Figura 25. Indução de edema pelas PLA ₂ s de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e Lmr-PLA ₂ nas concentrações de 5 µg e 25 µg.....	61
Figura 26. Atividade miotóxica através da dosagem de creatina cinase em plasma de camundongos.....	64
Figura 27. Estudo de miotoxicidade <i>in vivo</i> após 3 horas de injeção de 25 e 50 µg de PLA ₂ de <i>C.d.terrificus</i> ou Lmr-PLA ₂	68
Figura 28. Parâmetros bioquímicos após 3 horas de injeção de 25 e 50 µg de PLA ₂ de <i>C.d.terrificus</i> ou Lmr-PLA ₂	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidades de substrato e PLA ₂ utilizadas no ensaio em microplaca de 96 poços para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} da PLA ₂ de <i>L. m. rhombeata</i>	25
Tabela 2. Diâmetros dos halos de hemólise das frações obtidas da filtração em gel da peçonha bruta de <i>L. muta</i> (PbLm) em <i>Sephacryl S200</i>	33
Tabela 3. Diâmetros dos halos de hemólise das frações obtidas da cromatografia de fase reversa da fração LmS-G.....	36
Tabela 4. Recuperação proteica e atividade PLA ₂ dos componentes cromatografados no processo de purificação da PLA ₂ de <i>Lachesis muta rhombeata</i>	37
Tabela 5. Níveis de proteínas plasmáticas após 3 horas de injeção de salina (controle), PLA ₂ de <i>C.d.terrificus</i> e Lmr-PLA ₂ em 25 e 50 µg, respectivamente.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AA:	Ácido araquidônico
ADP:	Adenosina 5'-difosfato
ACN:	Acetonitrila
AZT:	Anilino-tiazolína
CID-MS/MS:	collision-induced dissociation
CK:	creatina cinase
COX:	Ciclooxigenase
cPLA ₂ s:	Fosfolipases A ₂ citosólicas
DTT:	Ditiotreitol
ESI-TOF:	Eletrospray triplo-quadrupolo
FPLC:	Cromatografia líquida rápida de proteínas (<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)
Gama GT:	γ -glutamyltranspeptidase
iPLA ₂ s:	Fosfolipases A ₂ Ca ²⁺ -independentes
K _m :	Constante de Michaelis-Menten
MALDI-TOF:	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight
NaCl:	Cloreto de Sódio
NOB	(4-Nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid)
PAF-AH:	Fator ativador de plaquetas
PBS:	Tampão fosfato em salina
PC:	Fosfatidilcolina
pI:	Ponto Isoelétrico
PITC:	Fenilisotiocianato
PLA ₂ :	Fosfolipase A ₂
PPP:	Plasma pobre em plaquetas
PRP:	Plasma rico em plaquetas
PTH:	Feniltiohidantoína
SD:	“ <i>Standard Deviation</i> ” - Desvio padrão
SDS-PAGE:	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil sulfato de sódio
sPLA ₂ s:	Fosfolipases A ₂ secretórias
TFA:	Ácido Trifluoroacético
Tris-HCl:	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

TXA₂: Tromboxano A₂

TXB₂: Tromboxano B₂

VC: Volume de coluna

V_{max}: Velocidade máxima

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	v
Lista de abreviaturas.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Serpentes brasileiras e acidentes ofídicos.....	2
1.2. Gênero <i>Lachesis</i>	4
1.3. Composição de peçonhas.....	7
1.4. Fosfolipase A ₂	8
1.5. Efeitos farmacológicos das PLA ₂ s.....	12
1.6. PLA ₂ s como alvos terapêuticos.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1.1. Peçonha de <i>Lachesis muta rhombeata</i>	19
3.1.2. Animais.....	19
3.2.1. Fracionamento da peçonha por Gel Filtração em <i>Sephacryl</i> TM S-200.....	19
3.2.2. Cromatografia de Fase Reversa da fração LmS-G em coluna <i>C18 Shimadzu</i>	20
3.2.3. Determinação quantitativa de proteínas	20
3.2.4. Ensaio de Hemólise Radial Indireta.....	20
3.2.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS.....	21
3.2.6. Espectrometria de massas.....	21
3.2.7. Sequenciamento amino-terminal da PLA ₂	22
3.2.8. Sequenciamento por espectrometria de massas.....	22
3.2.9. Determinação do ponto isoelétrico (pI).....	24
3.2.10. Ensaio de cinética enzimática da Lmr-PLA ₂ através de ensaio colorimétrico.....	24
3.2.11. Efeito sobre plaquetas.....	25
3.2.12. Indução de edema.....	26
3.2.13. Atividade miotóxica.....	26
3.2.14. Estudos histológicos.....	26

3.2.15. Determinação de parâmetros bioquímicos.....	27
3.2.16. Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1. Cromatografia de Filtração em Gel <i>Sephacryl S-200</i>	30
4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (C18) da fração LmS-G.....	34
4.3. Espectrometria de massas.....	41
4.4. Sequenciamento da Lmr-PLA ₂	42
4.5. Determinação do ponto isoeletrico.....	51
4.6. Ensaio de cinética enzimática da Lmr-PLA ₂ através de ensaio colorimétrico.....	52
4.7. Atividade sobre plaquetas.....	56
4.8. Indução de edema.....	60
4.9. Miotoxicidade.....	63
4.10. Estudos Histológicos.....	67
4.11. Parâmetros bioquímicos.....	70
5.CONCLUSÃO.....	74
6. REFERÊNCIAS.....	77
ANEXOS.....	91
APÊNDICES.....	94

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Serpentes brasileiras e acidentes ofídicos

Durante muito tempo, os animais peçonhentos e venenosos têm fascinado milhares de pessoas de diferentes culturas. Desde o desenvolvimento da ciência e medicina, as toxinas desses animais estão cercadas de mitos e realidades (HARVEY, 2009).

Atualmente, as serpentes constituem o segundo grupo mais diversificado dos répteis, com aproximadamente 3.200 espécies existentes no mundo, sendo que 375 espécies de serpentes ocorrem no Brasil (BÉRNILS; COSTA, 2011). Dentre as famílias encontradas no Brasil, somente duas são consideradas peçonhentas (Elapidae e Viperidae), pois possuem glândulas especializadas na produção de peçonha e aparelho inoculador (CARDOSO, 2009).

Com relação ao aparato inoculador, as serpentes podem ser áglifas (não possuem dentes com o ducto, mas podem ter glândula ou não); opistóglifas (possuem dentes inoculadores na região posterior do maxilar); proteróglifas (possuem dentes na região anterior do maxilar e são pouco desenvolvidos) ou solenóglifas (dentes desenvolvidos e na região anterior do maxilar) (BRASIL, 2012).

As serpentes da família Viperidae representam o grupo de serpentes que causam maior impacto na área da saúde pública, pois são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos de relevância clínica não só no Brasil, mas também em outros países americanos. Esta família é representada pelos gêneros *Bothriopsis*, *Bothropoides*, *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Rhinocerophis* e têm dentição solenóglifa (BÉRNILS; COSTA 2011). Já a família Elapidae, apresenta 27 espécies, sendo a maioria pertencente ao gênero *Micrurus* (BÉRNILS; COSTA 2011), que são serpentes com dentição proteróglifa (MELGAREJO, 2009).

De acordo com o Ministério da Saúde, o Brasil apresentou 30.836 acidentes ofídicos em 2011, sendo o maior número de casos ocorridos na região Norte (9.309), seguido das regiões Nordeste (8.081), Sudeste (7.493), Centro-Oeste (3.285) e Sul (2.668) (Fig. 1). Foram registrados 143 óbitos relacionados a esses acidentes (BRASIL, 2012). Observa-se o grande número de casos que acontecem anualmente no nosso país e isso revela uma das justificativas do estudo do componente dessas peçonhas e de suas atuações fisiopatológicas no envenenamento.

Figura 1. Relação entre os casos de acidentes ofídicos Em 2011 e as regiões do Brasil. Dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2012).

O maior número de acidentes ofídicos são causados pelas serpentes do gênero *Bothrops*, *Bothropoides*, *Bothriopsis* e *Rhinoceros* (jararacuçu, jararaca, urutu, caíçaca, comboia) e são caracterizados por uma ação proteolítica local, coagulante e hemorrágica. A ação proteolítica é demonstrada através de edema, bolha e necrose no local da picada, causando lesões locais e destruição tecidual. Além disso, podem ocorrer equimoses, sangramentos locais e até amputação do membro afetado (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009).

Com relação à atividade coagulante, a peçonha botrópica tem uma ação semelhante à trombina levando ao consumo de fibrinogênio e incoagulabilidade sanguínea, que juntamente com a ação de hemorraginas na membrana basal dos capilares sanguíneos provocam sangramentos tanto no local da picada quanto em mucosas (gengivorragia, epistaxe, sangramento bucal) e urinário. Com isso, podem ocorrer complicações como insuficiência renal aguda e choque, levando muitas vezes o paciente a óbito (CAMPBELL; LAMAR, 1989; FRANÇA; MÁLAQUE, 2009).

Já o acidente crotálico (gênero *Crotalus*) possui ação sistêmica preponderante. Ele é caracterizado por uma atividade neurotóxica através da atuação de uma neurotoxina pré-sináptica, a crotoxina. Essa toxina inibe a liberação de acetilcolina, causando paralisia flácida da musculatura esquelética facial, ocular e podendo levar à insuficiência respiratória. Além da crotoxina, são encontradas na peçonha outras neurotoxinas, como a crotamina, convulxina e giroxina (CAMPBELL; LAMAR, 1989; MARQUES; HERING; CUPO, 2009).

Além da ação neurotóxica, o envenenamento por essas serpentes possui uma ação miotóxica, pela ação de miotoxinas na musculatura esquelética e liberação de mioglobina,

podendo levar à insuficiência renal aguda. Outra atividade encontrada na peçonha é a coagulante atribuída a componentes com atividade trombina-símile (MARQUES; HERING; CUPO, 2009).

O acidente elapídico é causado pelas serpentes do gênero *Micrurus*, corais verdadeiras, e não provoca alterações locais evidentes, porém suas alterações sistêmicas são muito graves. A peçonha dessas serpentes possui uma ação neurotóxica pré e pós-sináptica importante e as manifestações do envenenamento são dor, visão dupla, ptose palpebral e pode ocorrer paralisia da musculatura respiratória pouco tempo após a picada (SILVA JR.; BUCARETCHI, 2009).

1.2. Gênero *Lachesis*

As serpentes da família Viperidae e gênero *Lachesis* são as maiores serpentes peçonhentas da América Latina, podendo atingir até 4 m de comprimento. É conhecida no Brasil como surucucu, surucucu-pico-de-jaca e surucutinga. Devido ao seu tamanho, a quantidade de peçonha obtida é, em geral, bastante superior àquela extraída de outras serpentes como *Bothrops* e *Crotalus* (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009).

O gênero *Lachesis* incluía em sua única espécie *muta*, quatro subespécies: *L. m. stenophrys*, distribuída na costa Atlântica da Nicarágua, além de Costa Rica, Panamá e na Colômbia na sua região do Oceano Pacífico; *L. m. melanocephala*, restrita da Costa Rica; *L. m. muta* presente em florestas tropicais da Colômbia, Venezuela, Guianas, Suriname, Peru, Equador e Brasil e *L. m. rhombeata* presente na floresta atlântica do nordeste brasileiro, mais precisamente do Ceará ao Rio de Janeiro (CAMPBELL; LAMAR, 1989). No entanto, segundo estudos realizados por Zamudio e Greene (1997), através de análises filogenéticas da sequência de DNA mitocondrial, as serpentes do gênero *Lachesis* devem ser classificadas em três diferentes espécies: *L. stenophrys* e *L. melanocephala* distribuídas na América Central e *L. muta* na América do Sul. Ou seja, segundo os autores, as espécies *Lachesis muta muta* e *Lachesis muta rhombeata* podem ser denominadas apenas de *Lachesis muta* (Fig. 2).

Figura 2. Serpente *Lachesis muta rhombeata*. Fonte: Laboratório de Toxinas Animais Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Ribeirão Preto - USP.

Apesar de concluírem que não havia diferenças significativas entre as duas subespécies, Zamudio e Greene (1997) observaram que as serpentes obtidas do Mato Grosso (*L. m. muta*) eram mais próximas das obtidas da floresta atlântica (*L. m. rhombeata*) do que de espécies obtidas do Suriname e Equador (*L. m. muta*) sugerindo que uma revisão dessa taxonomia deveria ser realizada.

Fernandes, Franco e Fernandes (2004) analisaram diferentes espécies e subespécies de *Lachesis* com relação aos aspectos morfológicos externos dessas serpentes. Segundo os autores, as espécies centro-americanas *L. stenophrys* e *L. melanocephala* são espécies distintas e a *L. muta* seria monotípica, ou seja, não teria a divisão em subespécies. Eles sugerem que há uma independência entre as espécies da América Central e do Sul e que esses estudos corroboram com dados experimentais.

Porém, Madrigal et al. (2012), reportam que atualmente o gênero *Lachesis* tem sido classificado em 4 espécies: *L. stenophrys*, *L. melanocephala*, *L. muta* e *Lachesis acrochorda* (“Chochoan busmaster”), sendo esta última encontrada no Panamá, tanto na região do oceano Pacífico quanto Atlântico e no noroeste da Colômbia.

Análises filogenéticas combinadas com dados estatísticos sugerem que a *L. melanocephala* tem os componentes de sua peçonha mais próximos aos da serpente *Lachesis stenophrys* do que da *Lachesis muta* (MADRIGAL et al., 2012).

Vários estudos de proteoma têm sido realizados com essas serpentes a fim de se determinar as divergências ou semelhanças entre as peçonhas de diferentes espécies incluídas no gênero *Lachesis* e também para identificar suas alterações ontogenéticas, ou seja, as diferenças encontradas na peçonha de acordo com a idade da serpente.

Otero e colaboradores (1998) compararam a peçonha de três subespécies de *Lachesis muta* (*Lachesis muta stenophrys*, *Lachesis muta muta* e *Lachesis muta rhombeata*) do Brasil, Colômbia e Costa Rica, e mostraram que todas as peçonhas induzem hemorragia, formação de edema, miotoxidade e efeito defibrinante e coagulante. Além disso, encontraram também atividades proteolíticas e hemolíticas. Os resultados demonstraram que as peçonhas de *Lachesis muta stenophrys* e de *Lachesis muta muta* possuem maior letalidade e atividade hemorrágica, enquanto que a peçonha de *Lachesis muta rhombeata* mostra maior atividade coagulante; no entanto, não há grandes diferenças na miotoxidade e formação de edema. Apesar das diferenças quantitativas em toxicidade e atividades enzimáticas entre as peçonhas, todas elas apresentam perfis patofisiológicos semelhantes.

O envenenamento por esse gênero de serpentes é raro, pois o fato de habitarem florestas tropicais torna difícil sua captura e manutenção em cativeiro. A peçonha das serpentes do gênero *Lachesis* possui ação proteolítica, coagulante, hemorrágica e neurotóxica e, apesar de difíceis de ocorrer, os acidentes laquéticos costumam ser graves. Os sintomas clínicos são: dor, edema, hipotensão, alteração da coagulação sanguínea, sangramentos e síndrome vagal, com náuseas, vômitos e diarreia (JORGE et al., 1997; PARDAL et al., 2007).

Esses sintomas são semelhantes aos do acidente botrópico; porém, a síndrome vagal (hipotensão, náuseas, vômitos e diarreia) só ocorre no acidente laquético, sendo importante no diagnóstico diferencial. A ausência de sintomas neurotóxicos não significa necessariamente tratar-se de envenenamento botrópico, pois parte dos acidentes laquéticos não apresentam esses sintomas. Diferem também quanto à ação coagulante, sendo bem mais intensa no acidente laquético (CARDOSO et al., 2009).

O tratamento é realizado com aplicação de soro antibotrópico-laquético por via intravenosa e a quantidade aplicada vai depender da gravidade do caso. Os casos são classificados apenas em moderados ou graves (PARDAL et al., 2007).

O soro antibotrópico-laquético possui a propriedade de neutralizar os efeitos induzidos tanto pela peçonha botrópica quanto laquética; porém, a administração desse soro tem uma série de desvantagens que residem na baixa eficiência do soro (a imunização de animais com misturas complexas de antígenos pode levar à produção de anticorpos predominantemente contra as toxinas presentes em apenas uma das espécies; e redução da resposta imune devido à presença de proteínas na peçonha com atividade imunossupressora). O ideal seria a administração de um soro monoespecífico (CARDOSO et al., 2009).

1.3. Composição de peçonhas

As peçonhas de serpentes e outros animais têm sido analisadas por apresentarem inúmeras substâncias de composições distintas. Esses componentes ativos despertam grande interesse entre os pesquisadores, pois podem ser utilizados como ferramentas importantes para o estudo de vários processos fisiológicos e patológicos, como a inflamação, agregação plaquetária, hemostasia, entre outros (COMINETTI; PONTES; SOUZA, 2007).

Cerca de 90% a 95% do peso seco da peçonha consiste de proteínas. Dessas proteínas, um grande número são responsáveis por interferir na hemostasia, em processos inflamatórios e por causarem hemorragias, como serinoproteases, fosfolipases A₂ (PLA₂), metaloproteases, e outras, como desintegrinas e lectinas tipo-C, que não possuem atividade enzimática (BRAUD; BON; WISNER, 2000; MARKLAND, 1998), mas contribuem para os danos ocasionados nas vítimas.

Os componentes podem ser divididos em inorgânicos e orgânicos. Entre os inorgânicos estão: cálcio, ferro, cobre, manganês, zinco, e os orgânicos são classificados como proteínas, carboidratos, lipídeos, nucleotídeos, aminas biogênicas, entre outros (VARANDA; GIANNINI, 1999). As toxinas animais são muito complexas, contendo polipeptídeos, proteínas de alta e baixa massa molar, lipídeos, esteroides, polissacarídeos, glicosídeos, aminoácidos livres, bem como histamina, serotonina e outras substâncias (WATKINS, 2008).

O estudo dessas diferentes toxinas é muito relevante, pois servem como ferramentas para a compreensão de sistemas fisiológicos complexos, como sistema nervoso, cardiovascular, coagulação e homeostasia. Além disso, podem ser utilizadas como novas fontes para a formulação de fármacos que poderão ser administrados como agentes terapêuticos sobre diversas patologias.

Com relação à peçonha da serpente *Lachesis muta*, esta possui componentes orgânicos e inorgânicos. Dentre os constituintes orgânicos, podemos citar as proteínas, peptídeos, aminoácidos, carboidratos e lipídeos. Entre os constituintes inorgânicos presentes estão Zn^{+2} , Ca^{+2} , K^+ , Mg^{+2} , Na^+ , SO_4^{-2} , Cl^- , PO_4^{-3} (CARDOSO et al., 2009).

Até o momento foram descritas na peçonha de *L. muta* enzimas semelhantes à trombina ou trombina-símile (MAGALHÃES et al., 2006), peptídeos potenciadores de bradicinina (GRAHAM et al., 2005), metaloproteases, como a LHF-I e II (RUCAVADO et al., 1999), uma L-aminoácido oxidase (BREGGE-SILVA et al., 2012), lectina (ARAGÓN-

ORTIZ; BRENES-BRENES; GUBENSEK, 1989) e fosfolipases A₂ (FULY, 2000; DAMICO, 2012).

1.4. Fosfolipase A₂

Os componentes da peçonha de *Lachesis*, assim como os componentes das demais serpentes da família Viperidae, são em sua maioria, enzimas. Dentre estas podemos citar as fosfolipases que catalisam a hidrólise dos fosfolipídeos que compõe as membranas celulares em quatro diferentes posições. Essas enzimas recebem designações diferentes dependendo do sítio de hidrólise.

No caso das fosfolipases A₂ (PLA₂s) [E.C 3.1.1.4], a quebra da ligação ocorre na posição sn-2 dos fosfolipídeos (Fig. 3) de membranas biológicas e artificiais, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídios (ARNI; WARD, 1996; BURKE; DENNIS, 2009; KINI, 2006; KUDO; MURAKAMI, 2002).

Figura 3: Posição de hidrólise das fosfolipases. Fonte: Kini (1997).

As PLA₂s são amplamente encontradas em mamíferos. Por clivar os fosfolipídeos de membrana, essas enzimas possuem um papel fundamental no catabolismo de lipídeos da dieta, além de participar da manutenção de fosfolipídeos celulares e remodelamento das membranas (DENNIS, 1994).

Entre os ácidos graxos liberados com a quebra da ligação, está o ácido araquidônico que é um precursor de eicosanóides e promotor da inflamação (DENNIS, 1997). As fosfolipases A₂ também são encontradas no meio extracelular em secreções pancreáticas e exsudatos de inflamações.

As PLA₂s são classificadas em 15 grupos com base no padrão de pontes dissulfeto, similaridade de sequência de aminoácidos e mecanismos catalíticos (hidrolases His/Asp, Ser/Asp ou Ser/His/Asp). Estes grupos são ainda divididos em vários subgrupos, de acordo com diferenças estruturais e funcionais (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

Inicialmente, as PLA₂s de serpentes foram classificadas nos grupos I e II e a de abelha no grupo III. Com a descoberta de duas PLA₂s humanas, uma secretada (1989) e a outra citosólica (1991), foi necessário estabelecer uma sistemática para a classificação de PLA₂s. As duas últimas foram classificadas nos grupos II (e depois IIA) e III (IIIA), respectivamente. Nos últimos anos novas classificações têm sido publicadas (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

Dentro desses grupos estão incluídas: as PLA₂s secretórias (sPLA₂s), que são encontradas nas serpentes, mamíferos e plantas; as independentes de Ca²⁺ (iPLA₂s), que são proteínas de membrana de fonte murina e humana; as citosólicas (cPLA₂s), que são encontradas no citosol; as PLA₂s lisossomais, que são enzimas glicosiladas encontradas nos lisossomas; além das acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH) (KANG et al., 2011; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As sPLA₂s possuem massa molar entre 14-18 kDa, são extremamente estáveis e comumente encontradas na peçonha de serpentes (Hydrophidae, Elapidae, Viperidae e Crotalidae), abelhas, escorpiões, vespas ou em órgãos de mamíferos, como fígado e rins (KANG et al., 2011; SILVEIRA, 2011; VARANDA; GIANNINI, 1999).

Além disso, as sPLA₂s contêm de 5 a 8 pontes dissulfeto e exercem sua função de catálise na presença de íons Ca²⁺. Essa classe de PLA₂s secretória é encontrada nos grupos IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, XIA, XIB, XII, XIII e XIV (RODRIGUES 2010; BURKE; DENNIS, 2009; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As sPLA₂s ofídicas, como já dito anteriormente, estão presentes nos grupos I e II, sendo que o I pertence às famílias Elapidae e Hydrophidae e o II à família Viperidae. Elas são constituídas de 120 a 125 resíduos de aminoácidos, e as enzimas do grupo II possuem 5 a 7 resíduos de aminoácidos a mais do que o grupo I. A estrutura conservada dessa proteína corresponde a 3 hélices principais com 7 pontes dissulfeto interligadas entre elas (CARVALHO, 2011; KANG et al., 2011).

O grupo II das PLA₂s é dividido em: PLA₂s Asp49, que possuem o aminoácido aspartato na posição 49 e PLA₂s Lys49, que possuem o aminoácido lisina na mesma posição. As Asp49 são, em sua grande maioria, cataliticamente ativas, enquanto que as Lys49 não possuem atividade enzimática sobre substratos ou a atividade é baixa. Porém, mesmo sendo cataliticamente inativas ou tendo baixa atividade, as fosfolipases A₂ Lys49 possuem atividade

biológica causando elevada miotoxicidade (ZULIANI et al., 2005). É importante ressaltar que essas enzimas podem ser ácidas ou básicas, independentemente do resíduo presente na posição 49 (RODRIGUES, 2010).

As PLA₂s Lys49 são incapazes de incorporar o íon Ca²⁺ à sua molécula. Esse íon é fundamental para a atividade catalítica, atuando como cofator. Ele estabiliza o intermediário da ligação e orienta o substrato ao local de hidrólise. O grupamento carboxila presente no resíduo da Asp49 juntamente com 3 moléculas de oxigênio presentes nos resíduos Tyr28, Gly30 e Gly32, são responsáveis pela ligação do cálcio (SCOTT et al., 1990; VERHEIJ et al., 1980).

No mecanismo modelo de hidrólise dessas moléculas, o aminoácido His na posição 48 juntamente com o aminoácido Asp na posição 99 funcionam em conjunto como acceptor de prótons, facilitando o ataque nucleofílico na posição sn-2 do fosfolípídeo (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

Esse mecanismo de ação das PLA₂ ocorre em três etapas: 1) desprotonação da molécula de água pelos aminoácidos His48 e Asp99; 2) a água desprotonada atua como nucleófilo na ligação sn-2 do glicerofosfolípídeo e ocorre a formação de um intermediário tetraédrico estabilizado pelo cofator Ca²⁺ e 3) ocorre a quebra do intermediário tetraédrico com liberação dos ácidos graxos e lisofosfolípídeos (BERG et al., 2001; VERHEIJ et al., 1980).

Embora a grande maioria das fosfolipases Asp49 sejam cataliticamente ativas, Corrêa et al., (2008) realizaram estudos sobre uma PLA₂ (Bth-TX-II) da serpente *Bothrops jararacussu* que apesar da presença do resíduo Asp na posição 49, possui baixa atividade catalítica e elevada miotoxicidade. Os autores demonstraram que há uma distorção dessa molécula com relação à sua região de ligação ao cálcio e um deslocamento da região C-terminal, explicando sua baixa atividade catalítica. Dessa forma, fica claro que ter os aminoácidos responsáveis pela ligação ao cálcio não garantem que as PLA₂s tenham atividade catalítica. Estes resíduos devem estar coordenados para realizar a ligação com o íon.

Com relação à estrutura, as PLA₂s possuem muitos resíduos conservados nas suas moléculas, principalmente entre os aminoácidos responsáveis pela atividade catalítica. Mesmo possuindo alta identidade sequencial, as PLA₂s possuem algumas diferenças entre os grupos I e II (KANG et al., 2011). As diferenças estão principalmente nas posições de resíduos de cisteína nas suas sequências. As enzimas dos dois grupos possuem 7 pontes dissulfeto. As PLA₂s do grupo II apresentam 5-7 resíduos de aminoácidos a mais no C-terminal do que as do grupo I (KANG et al., 2011).

Figura 5: Estrutura tridimensional representativa de PLA₂s do grupo II. Fonte: Kang et al., 2011.

As PLA₂s do grupo II têm sido extensivamente estudadas, principalmente por serem consideradas importantes alvos terapêuticos de anti-inflamatórios. Por esse motivo, várias estruturas desse grupo de PLA₂s já foram elucidadas, como da serpente *Echis carinatus* (JASTI et al., 2004), da *Bothrops jararacussu* (KETELHUT et al., 2003), *Daboia russelli* (CHANDRA et al., 2000), entre outras.

1.5. Efeitos farmacológicos das PLA₂s

Embora as PLA₂s de peçonhas de serpentes apresentem alta identidade entre suas estruturas primárias, secundárias e terciárias, estas enzimas possuem uma grande variedade de efeitos farmacológicos. Até o momento, a sequência de aminoácidos de mais de trezentas PLA₂s de peçonhas de serpentes já foram depositadas. Essas sequências possuem de 44-99% de identidade (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

Além disso, os efeitos farmacológicos das PLA₂s são independentes ou dependentes da sua atividade enzimática. Quando dependentes da atividade enzimática, há a hidrólise da membrana e a liberação de ácidos graxos e lisofosfolípidos. Esses irão atuar como mediadores sobre diversas atividades biológicas, como ativadores de plaquetas, lise celular e formação do ácido araquidônico. Este servirá como um precursor da síntese de segundos mensageiros, como prostaglandinas e tromboxanos (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

No mecanismo independente da atividade enzimática, a PLA₂ pode causar seu efeito farmacológico como antagonista ou agonista de alvos celulares. Nas interações antagonistas, essas enzimas competem com os ligantes naturais ou primeiros mensageiros dos receptores celulares, aumentando a produção de segundos mensageiros (como cAMP e Ca²⁺). Na interação agonista, elas atuam como ligantes, aumentando a concentração de segundos mensageiros no alvo celular (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

Kini e Evans (1987) identificaram uma região anticoagulante das PLA₂s entre os resíduos 54 e 77, sendo que a diferença dessas enzimas com relação à sua atividade anticoagulante (forte, fraca e sem atividade) estaria relacionada aos resíduos presentes nessa região. Quando essa porção de aminoácidos é carregada positivamente, a atividade anticoagulante é forte; porém, quando carregada negativamente, a atividade é fraca ou não ocorre (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

Além disso, de acordo com Dos Santos et al. (2009), PLA₂s Lys49 têm sido alvo de muitos estudos devido à sua intensa atividade miotóxica. O sítio responsável por essa atividade vem sendo estudado extensivamente por pesquisadores. Estudos com peptídeos sintéticos e mutagênese sítio-dirigida sugerem que a região C-terminal das PLA₂s é a responsável pela sua atividade miotóxica. Lomonte et al. (2003) propuseram um modelo de interação dessa região C-terminal com a membrana. De acordo com os autores, essa região entre as posições 115 e 129 seria composta de aminoácidos carregados positivamente, os quais interagiriam com a membrana aniônica fosfolipídica.

As PLA₂s Lys49 miotóxicas das serpentes do gênero *Bothrops* são diméricas. Segundo Ângulo et al., (2005), a dissociação desses dímeros diminui a miotoxicidade. Dos Santos et al. (2009) complementam esta hipótese, sugerindo que a simetria entre os dois monômeros é fundamental para a atividade miotóxica da região C-terminal.

De acordo com Doley, Zhou e Kini (2010), as PLA₂s possuem alguns sítios específicos de ligação, como é o caso do sítio neurotóxico. Kini e Iwanaga (1986) propuseram que a hélice E hidrofóbica, presente na estrutura das PLA₂s neurotóxicas, estaria relacionada à neurotoxicidade pré-sináptica dessas enzimas. Khan (2002), através da comparação entre 40 sequências de aminoácidos de PLA₂s neurotóxicas notou que essas enzimas possuíam um sítio hidrofóbico na região 80-110 de seus aminoácidos. Já Pungercar et al. (1999), através de estudos de mutagênese sítio-dirigida, identificaram que o aminoácido fenilalanina na posição 124 (Phe124) na região C-terminal estaria relacionado à neurotoxicidade dessas enzimas.

Com relação à agregação plaquetária, as PLA₂s podem ser classificadas em três grupos distintos: a) PLA₂s que iniciam a agregação plaquetária; b) PLA₂s que inibem a agregação

plaquetária, e esse efeito pode ou não estar relacionado com a atividade catalítica e c) PLA₂s de efeito bifásico, que induzem a agregação em baixas concentrações e pouco tempo de incubação, mas que inibem a agregação das plaquetas em maiores concentrações (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010; KINI; EVANS, 1997).

Outro efeito atribuído às PLA₂s é a indução de edema. Essa atividade estaria relacionada à hidrólise de fosfolípídeo e liberação de ácido araquidônico, que é transformado em prostaglandina e leucotrienos. Este último aumenta a permeabilidade vascular levando à formação de edema (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

Várias fosfolipases A₂ de peçonhas ofídicas têm sido isoladas das espécies de *Bothrops jararacussu* (FULY et al., 2004; KETELHUT et al., 2003) e possuem uma alta atividade PLA₂. Danielle et al. (1995; 1997) isolaram e caracterizaram três PLA₂s ácidas da serpente *B. neuwiedi* com atividade miotóxica.

Outras PLA₂s de serpentes *Bothrops* foram caracterizadas, demonstrando atividades tóxicas sobre fígado, pulmões, coração (NISEBOM; SEKI; VIDAL, 1986), inibição da agregação plaquetária (MODESTO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007), atividade hemolítica indireta (RODRIGUES et al., 2007) e atividade antibacteriana, antitumoral e antifúngica (SANTOS-FILHO et al., 2008).

Além dessas atividades descritas acima, as PLA₂s encontradas em peçonhas, podem induzir cardiotoxicidade, neurotoxicidade, edema, efeito anticoagulante e hipotensão (KETELHUT et al., 2003; LEITE, 2007; STILES; SEXTON; WEINSTEN, 1991).

Até o momento, cinco PLA₂s da peçonha de *Lachesis muta* já foram isoladas e caracterizadas. Duas isoformas ácidas, LM-PLA₂-I e LM-PLA₂-II, induzem mionecrose em camundongos, com ação direta sobre as fibras musculares ou agindo indiretamente pela liberação de creatina-quinase (FULY et al., 2000; 2002). E três PLA₂s básicas, Lmr-Tx, LmTx-I e II, com atividade antitrombótica e anticoagulante (DAMICO et al., 2005; 2012).

1.6. PLA₂s como alvos terapêuticos

Pelo fato de possuírem inúmeros efeitos farmacológicos, como vimos anteriormente, as PLA₂s têm sido estudadas como futuros alvos terapêuticos ou servindo de base para o desenvolvimento de novos fármacos. Segundo Yedgar, Lichtenberg e Schnitzer (2000), o estudo de inibidores específicos de PLA₂s pode ser importante na produção de moléculas anti-inflamatórias. Um exemplo é o inibidor de sPLA₂, LY3330, que têm demonstrado eficácia

nos estudos para o tratamento de paciente asmáticos e com artrite reumatoide (BOWTON et al., 2005; BRADLEY et al., 2005).

Além disso, Rodrigues et al. (2009), descrevem que a atividade fosfolipásica está aumentada em diversos tipos de cânceres humanos. Segundo os autores, essas enzimas têm um papel fundamental no desenvolvimento e progressão tumoral, servindo, assim, de alvos na terapia anticâncer.

Muitos estudos demonstraram uma atividade antitumoral direta das PLA₂s. Segundo Rodrigues et al. (2009), essa atividade seria independente da atividade catalítica. Essas enzimas estariam envolvidas em processos de citotoxicidade e miotoxicidade. Estudos sugerem que esse efeito é alcançado devido à inibição do fator de crescimento do endotélio vascular, relacionado com a angiogênese (ZULIANI et al., 2005; STÁBELI et al., 2006).

Outra atividade farmacológica relacionada às PLA₂s, é a antimicrobiana. Segundo Weiss et al. (1994), a basicidade presente na hélice N-terminal de algumas PLA₂s seria a responsável por uma ação bactericida dessas enzimas. Nevalainen, Graham e Scott (2007) relatam que os mecanismos antimicrobianos das PLA₂s estão baseados na presença de cargas positivas na sua estrutura e na sua atividade fosfolipídica. Além disso, as PLA₂s estariam aumentadas em casos de sepse e de choque séptico, ou seja, a inibição dessas enzimas poderia servir de alvo terapêutico no controle e tratamento de doenças relacionadas à atividade microbiana.

As PLA₂s das peçonhas de serpentes são um grande desafio com relação à determinação da sua estrutura-função e seu mecanismo de ação. Por esse motivo, o estudo dessas enzimas com relação à sua estrutura e atividade é de extrema importância para o conhecimento de suas interações e dos seus alvos celulares (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

Dada a importância biológica das fosfolipases A₂, o presente trabalho tem a finalidade de apresentar a purificação de uma nova PLA₂ da peçonha da serpente *L. muta* e a caracterização bioquímica, estrutural e funcional da enzima através de estudos sobre a agregação plaquetária, formação de edema e miotoxicidade.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram o isolamento, a caracterização estrutural e bioquímica de uma nova fosfolipase A₂ presente na peçonha da serpente *Lachesis muta rhombeata*.

Para isto, foram realizados os seguintes estudos:

- Isolamento da PLA₂ da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* através de técnicas cromatográficas
- Determinação da massa molar por espectrometria de massas e confirmação da pureza por SDS-PAGE
- Sequenciamento da proteína por espectrometria de massas e por degradação de Edman.
- Determinação do ponto isoelétrico (pI) da proteína
- Ensaio de cinética enzimática da Lmr-PLA₂, através de ensaio colorimétrico, para determinação de K_m , V_{max} e outros parâmetros cinéticos.
- Avaliação da atividade enzimática através do ensaio de hemólise radial indireta
- Avaliação da atividade biológica da fosfolipase através de ensaios sobre agregação plaquetária, formação de edema, miotoxicidade e determinação de parâmetros bioquímicos plasmáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL E ANIMAIS

3.1.1. Peçonha de *Lachesis muta rhombeata*

A peçonha bruta da serpente *Lachesis muta* subespécie *Lachesis muta rhombeata* originária de Ilhéus – Bahia foi adquirida do serpentário Bosque da Saúde - Americana- SP (Registro IBAMA: 647.998). A peçonha foi dessecada e estocada a -20°C até o momento do uso.

3.1.2. Animais

Para o ensaio de hemólise radial indireta, foram utilizados camundongos *Balb C* machos de 20 ± 1 g e para os ensaios de atividade edematogênica, miotóxica e avaliação de parâmetros bioquímicos séricos foram utilizados camundongos *Swiss* machos, pesando entre 18-25 g. Ambos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto-SP. Os projetos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, sob o n ° 12.1.112.53.8 (ANEXOS).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Fracionamento da peçonha por filtração em gel em coluna *HiPrep Sephacryl S-200*.

Primeiramente, a peçonha bruta de *L. muta* foi preparada e submetida a uma cromatografia de exclusão molecular, ou filtração em gel em coluna de *Sephacryl S-200* no sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC) *Äkta UPC 10 (GE)*. Os tubos correspondentes ao pico da fosfolipase A₂ (LmS-G) foram armazenados em tubos de fundo cônico a 4°C.

Antes das amostras serem aplicadas, as colunas foram equilibradas com Tris-HCl 20mM contendo NaCl 0,15M, pH 7,2 sob vazão de 0,5mL/min a 25°C.

A amostra (20mg da peçonha bruta *L. muta*) foi dispersa em 250 µL de tampão (o mesmo tampão da corrida) e centrifugada a 3000 x g por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso com 250 µL do mesmo tampão e centrifugado também a 3000 x g por 10 minutos. O volume das frações coletadas por tubo foi de 1,5mL e as corridas foram feitas em

1,5 VC (1 VC = 1 volume de coluna = 120 mL) e tiveram a duração de 5 horas e 30 minutos, em método isocrático. A absorbância foi determinada automaticamente em 280 nm. Todos os picos eluídos da exclusão molecular foram submetidos ao teste de hemólise radial indireta descrito no item 3.2.4.

3.2.2. Cromatografia de Fase Reversa da fração LmS-G em coluna C18

A segunda etapa de cromatografia foi realizada também no sistema *FPLC Äkta UPC 10*.

Cerca de 1 mL das amostras obtidas anteriormente pela filtração em gel foram preparadas com 500 µL da fase móvel inicial da corrida (TFA 0,1%) e centrifugadas a 2000 x g por 10 minutos. Posteriormente, foi injetado 1 ml dessa solução à coluna.

A coluna de fase reversa C18 (0,46 x 25 cm, com partículas de 5 µm, Shimadzu) foi equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e a eluição foi realizada com gradiente de concentração de acetonitrila (ACN) até 80% em TFA 0,1%, sob vazão de 0,5 mL/min e o volume coletado por tubo foi de 0,5 mL. A absorbância foi determinada automaticamente em 214 nm.

3.2.3. Determinação quantitativa de proteínas

Para a dosagem das proteínas, uma alíquota de 10 µL das frações foram diluídas em 490 µL de H₂O (diluída 50x). Após a diluição, a concentração de proteína foi determinada pelo método de Scopes (1974).

As medidas de absorbância em 280/205 nm foram registradas e o cálculo da concentração foi realizado pela equação descrita abaixo:

$$P(\text{mg} / \text{mL}) = \frac{Abs_{205nm}}{[27,0 + 120 (Abs_{280nm} / Abs_{205nm})]}$$

3.2.4. Ensaio de Hemólise Radial Indireta

A atividade fosfolipásica das amostras foi testada através do método de hemólise radial indireta descrito por Gutierrez (1988), que utiliza géis de agarose contendo eritrócitos de camundongos e gema de ovo como substrato. O sangue (1 mL) dos camundongos previamente anestesiados foi coletado, transferido para um tubo de fundo cônico (15 mL) e

foi adicionado PBS até um volume final de 12 mL. A mistura foi centrifugada a $1.000 \times g$ durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o procedimento foi repetido 3 vezes.

O gel foi preparado com uma mistura de CaCl_2 0,01 M; gema de ovo : PBS, pH 7,2 (1:3, v/v); eritrócitos : PBS (1:3, v/v); ágar bacteriológico 1%; azida de sódio 0,005%, sendo o volume final completado para 25 mL com PBS. A mistura, em temperatura de 45-50°C, foi vertida em placas de Petri para solidificar. Posteriormente, foram realizados orifícios de tamanho uniforme de 0,5 mm de diâmetro, os quais foram preenchidos com 10 µL das amostras a serem analisadas.

As placas contendo as amostras foram incubadas em estufa a 37 °C por 20 horas. A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel é um indicativo de atividade fosfolipásica. Posteriormente, os halos foram medidos em milímetros para a quantificação da atividade fosfolipásica A_2 .

3.2.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida com agente desnaturante (SDS-PAGE) foi realizada segundo Laemmli (1970). Primeiramente foi preparado um gel de resolução contendo bisacrilamida/acrilamida a 13,5% (m/v), tampão Tris-HCl 1M e SDS (dodecil sulfato de sódio) a 0,1%. O gel de concentração foi preparado a 5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M e SDS a 0,1% .

O segundo gel foi feito em concentração de acrilamida/bisacrilamina a 16% segundo Schagger e Jagow (1987). Neste gel é utilizado um tampão com Tris 2,0M e SDS a 0,3% , glicerol e dois tampões para a corrida eletroforética, um tampão do cátodo e ânodo.

Foram aplicados cerca de 10 µL de amostra contendo 10 µg de proteína. Os géis foram corados com *Cromassie Blue* e descorados com ácido acético.

3.2.6. Espectrometria de massas

A determinação da massa molar da fração correspondente à fosfolipase A_2 de *L. muta*, foi realizada por espectrometria de massas por MALDI-TOF (*Matrix Assited Laser Desorption/Ionization – Time of Flight*). A solução (10µg/1µL) contendo a PLA_2 foi cossedimentada com a matriz ácido sinapínico (SA) - 10 mg/mL em solução contendo 0,2% de TFA e 80% de ACN), na proporção 1:1 (v/v). As amostras foram ionizadas pela técnica de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz e analisadas em espectrômetro de massas

TOF (MALDI-TOF), modelo Ultraflex II (Bruker Daltonics - DE), equipado com uma fonte de laser do tipo *Nd-YAG Smartbeam laser* (MLN 202, LTB).

A análise foi realizada no Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais e Sintéticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão.

3.2.7. Sequenciamento amino-terminal da PLA₂

A determinação dos resíduos da extremidade N-terminal da fosfolipase A₂ de *Lachesis muta rhombeata* foi realizada em sequenciador automático de proteínas Shimadzu (Sistema PPSQ-33A). A sequência foi obtida através do método de degradação de Edman (EDMAN; BEGG, 1967), o qual consiste em três etapas: acoplamento, clivagem e conversão. Cerca de 100 pmoles da proteína purificada foram aplicados diretamente em uma membrana de fibra de vidro (Wako, Japão).

Na etapa de acoplamento, uma molécula de fenilisotiocianato (PITC) liga-se ao nitrogênio N-terminal do peptídeo, formando o PITC-peptídeo. Logo após, em meio ácido, o par de elétrons do enxofre proveniente do fenilisotiocianato ataca o primeiro carbono da ligação amídica do peptídeo, formando um composto cíclico tiazolínico, o ATZ-aminoácido, que se desliga do peptídeo restante. O ATZ-aminoácido em meio ácido sofre um rearranjo e forma assim, o PTH-aminoácido, o qual é então identificado em cromatografia de fase reversa. A quantificação e identificação das amostras são realizadas através da comparação com o padrão que contém 25 pmoles de cada aminoácido, analisado antes de cada sequenciamento (EDMAN; BEGG, 1967).

3.2.8. Sequenciamento por espectrometria de massas

A amostra de PLA₂ foi primeiramente digerida com tripsina. Para a digestão, foram adicionados 10 µg da proteína, 40 µL de uma solução de acetonitrila 40% em bicarbonato de amônio 0,1M, pH 7,8. Cerca de 5 µL do agente redutor DTT 45 mM também foram adicionados à amostra e incubados em banho a 56°C por 1 hora. Após isso, foi realizada a alquilação com 5 µL de uma solução de iodoacetamida 100 mM, por 1 hora na ausência de luz. A amostra foi então diluída 4x em bicarbonato de amônio 0,1M e a tripsina (Promega) foi adicionada (1 µg/20µL) em bicarbonato de amônio 0,1M e incubado por 24 horas a 37°C. A reação foi interrompida com 5 µL de ácido fórmico.

A solução tripsinizada foi dessalificada em micro-tip (*ZipTip*), que é uma micro coluna de fase reversa (POROS R2, Perseptive Biosystems, USA). A coluna foi ativada com 200 μ L de metanol e equilibrada com 200 μ L de ácido fórmico 0,2%. A amostra foi eluída da resina com 30 μ L de metanol 60% em ácido fórmico 5%. A maior parte da amostra, após eluída, foi aplicada em um espectrômetro de massas (ESI-MS) e uma pequena alíquota foi adicionada a uma solução de matriz (ácido 4-hidroxi-cinâmico a 5mg/mL em 50% de acetonitrila e 0,1% de TFA) e aplicada a um *target* da placa de MALDI, sendo, em seguida, analisada por MALDI-TOF/TOF.

A amostra contendo os peptídeos foi então aplicada através de uma bomba tipo seringa (Harvard, Inc, USA) a um fluxo de 300 nL/min e analisada em um espectrômetro de massas do tipo eletrospray triplo-quadrupolo (Quatro II, Micromass, Manchester, UK) com uma origem eletrospray do tipo nanovazão com capilar de sílica fundida 50 μ m de diâmetro interno mantido a 3,8 kVolts, 40 V, a 100° C. Os espectros foram coletados na forma de média de scans (15-30 scans) e o processamento dos dados foi feito em um software chamado MassLynx v.3.3 (Micromass, Manchester, UK).

Em uma primeira coleta de dados foi utilizada uma varredura em MS1 (400-1200 u.m.a), determinando-se a massa dos peptídeos (*peptide mass fingerprinting*). Foi selecionado cada íon de peptídeo detectado no primeiro quadrupolo e submetido a CID-MS/MS através da colisão com argônio com energia entre 20-40 eV e pressão de $3,0 \times 10^{-3}$ mBar. Com a colisão, os peptídeos foram fragmentados, originando fragmentos do tipo *b* e *y*. Os fragmentos foram utilizados para a dedução da sequência de aminoácidos.

Outra alíquota da amostra foi cocrystalizada com a matriz e aplicada ao MALDI-TOF/TOF-MS (Axima Performance, Kratos-Shimadzu, Manchester, UK). Antes de a amostra ser aplicada, o instrumento foi calibrado com uma mistura de peptídeos conhecida.

Os dados obtidos pelo ESI-MS e pelo MALDI-TOF/TOF-MS foram analisados em banco de dados como MASCOT, NCBI (BLAST) e SwissProt para a tentativa de obtenção e comparação de sequências homólogas. As sequências com maior identidade com a Lmr-PLA₂ foram alinhadas pelo programa MultAlin (CORPET, 1988) e a figura criada através do programa ESPript (GOUET et al., 1999).

O sequenciamento foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. José César Rosa do Centro de Química de Proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto- Faculdade de Medicina.

3.2.9. Determinação do ponto isoeletrico (pI)

A determinação do ponto isoeletrico foi realizada através de focalização isoeletrica em gel bidimensional (2-D) pelo sistema Ettan IpGphor3TM da GE de acordo com o fabricante.

Aproximadamente 25 µg de proteína foram ressuspensos em 125 µL de tampão de reidratação (ureia 7 M, thiourea 2 M, CHAPS 2% (m/v), DTT 10 mM, azul de bromofenol 0,002% e tampão IPG 0,5% (v/v), pH 3-10 (GE Healthcare). As tiras de poliacrilamida (7 cm de comprimento) com gradiente de pH imobilizado (pH de 3 a 10) foram reidratadas no sistema *IPGbox* durante 16 horas. Posteriormente, foi realizada a focalização isoeletrica das fitas no sistema Ettan IPGphor 3 com as seguintes condições: 200 V/1h, 3000 V/1h, 4000V/1h, 1250V/1h e 50V por 1h.

Entre a primeira e a segunda dimensão, as tiras focalizadas foram equilibradas em 10 mL de solução Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, ureia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,002% (m/v), contendo 10 mg/mL de ditioneína (DTT), durante 15 minutos. Em seguida, foi realizado um segundo equilíbrio adicionando iodoacetamida 25 mg/mL, por 15 minutos. Após o processo de equilíbrio, as tiras foram submetidas à *SDS-PAGE* 12,5% no sistema de eletroforese Mini VE (GE Healthcare), tal como descrito pelo fabricante, e o gel foi corado com Coomassie G-250 a 2% (m/v.)

O gel foi escaneado em scanner de imagens (GE Healthcare), usando *Image Master LabScanTM v Programa 5.0*, com uma resolução de 300 dpi. A análise foi realizada por *Imagem Platinum 2D Mestre v* (GE Healthcare).

A eletroforese bidimensional foi realizada em colaboração com o Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais da Universidade Federal de Uberlândia, em colaboração com a Profa. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.

3.2.10. Ensaio de cinética enzimática da Lmr-PLA₂ através de ensaio colorimétrico

O ensaio colorimétrico para determinar o K_m e V_{max} da fração Lmr-PLA₂ foi realizado segundo o método descrito por Petrovic et al. (2001) e adaptado para o volume de reação de 260 µL, conforme citado no APÊNDICE A.

O substrato NOB (*4-Nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid*) foi dissolvido em clorofórmio a uma concentração de 50 mg/mL e alíquotas de 20 µL (1 mg) foram distribuídas em microtubos (Eppendorf). Os microtubos permaneceram abertos até a evaporação total do solvente e posteriormente foram estocados a -20°C. Imediatamente antes do ensaio, o substrato foi ressuspensionado no tampão (4 mg/mL) e agitado vigorosamente em agitador de tubos

(Vórtex) por cerca de 10 minutos. Por fim, a solução foi centrifugada a 2000 xg , durante 2 minutos, a temperatura ambiente e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio.

A PLA₂ (fração Lmr-PLA₂) foi solubilizada no tampão do teste a uma concentração de 0,5 mg/mL e foram utilizados 10 μg (20 μL) de PLA₂ por poço. O substrato foi ressuspenso no mesmo tampão a uma concentração de 4 mg/mL e as concentrações finais de substrato foram de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,5 e 5,0 mM. Os poços foram completados com tampão até o volume final de 260 μL (Tab. 1). O ensaio foi realizado em triplicata.

A placa foi protegida da luz e incubada em banho maria a 37 °C, por 60 minutos e as absorbâncias foram determinadas em 425 nm. O gráfico e os valores de K_m e V_{max} foram obtidos utilizando o programa *GraphPadPrism* 5.0.

Tabela 1- Protocolo do ensaio em microplaca para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} da PLA₂ de *L. m. rhombeata*.

Branco	[S]						
	0,25 mM	0,5 mM	0,75 mM	1 mM	2,5 mM	5 mM	7,5 mM
S=0	S=5 μL	S=10 μL	S=15 μL	S=20 μL	S=50 μL	S=100 μL	S=150 μL
PLA ₂ =20 μL	PLA ₂ =20 μL	PLA ₂ =20 μL	PLA ₂ =20 μL	PLA ₂ =20 μL	PLA ₂ =20 μL	PLA ₂ =20 μL	PLA ₂ =20 μL
T=240 μL	T=235 μL	T=230 μL	T=225 μL	T=220 μL	T=190 μL	T=140 μL	T=90 μL

[S] = concentração de substrato (mM), S= volume de substrato utilizado (4 mg/mL), PLA₂= volume da solução de PLA₂ (0,5 mg/mL), T= volume de tampão (volume final de 260 μL). Ensaio realizado em triplicata (n = 3). Tempo de incubação: 60 minutos. Absorbância determinada em 425 nm.

3.2.11. Efeito sobre plaquetas

Para a atividade da PLA₂ sobre plaquetas, foi utilizado sangue de camundongo *Swiss* machos (18-25g) coletado com citrato de sódio. O sangue (1 mL) foi separado em microtubos (Eppendorf) e centrifugado a 1000 $x g$ por 12 minutos, obtendo-se o Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Cerca de 200 μL do PRP de cada tubo foi então separado para os testes. Os PRPs foram previamente incubados a 37 °C com 25 μg de PLA₂ de *Crotalus durissus terrificus* ou de Lmr-PLA₂ em cubetas de vidro siliconizadas. Após a incubação, foram adicionados os agonistas ADP ou Colágeno, dando início à agregação plaquetária. A agregação foi observada durante um período de 10 minutos através da análise turbidimétrica no Agregômetro Agg Ramm.

Os testes foram realizados em colaboração com o Centro de Química de Proteínas e Produtos Naturais da Universidade Federal de Uberlândia, em colaboração com a prof. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.

3.2.12. Indução de edema

A atividade de indução de edema foi realizada com 6 grupos de 3 camundongos *Swiss* machos (18-25g). Foram injetados na região subplantar da pata direita, via intradérmica (i.d), 50 μ L de solução. Nos primeiros dois grupos foi injetado apenas PBS (controle). Em outros dois grupos foram injetados PBS com PLA₂ (5 ou 25 μ g) da serpente *Crotalus durissus terrificus* e nos dois últimos grupos foram injetados Lmr-PLA₂ (5 ou 25 μ g). Antes da injeção, a espessura das patas foi medida (Tempo = 0h). Após a injeção, as medidas foram realizadas nos tempos 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 horas. Os valores obtidos foram subtraídos dos valores da espessura da pata determinada no tempo 0h e expressos em porcentagem do aumento da espessura das patas. Para a medição foi utilizado um paquímetro de baixa pressão 0,01 mm (Mytutoyo, Japão).

3.2.13. Atividade miotóxica

Em um primeiro grupo de três camundongos *Swiss* machos (18-30g) foram injetados no músculo gastrocnêmio 50 μ L de soluções contendo apenas PBS. Em outros dois grupos foram injetados 25 μ g de PLA₂ da serpente *Crotalus durissus terrificus* e de Lmr-PLA₂. E nos dois últimos grupos foram injetados 50 μ g de PLA₂ de *Crotalus durissus terrificus* e Lmr-PLA₂. Após três horas, os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina e Xilazina e o sangue foi coletado por punção cardíaca em tubo heparinizado, para separação do plasma e a determinação da atividade creatina quinase (CK) através do kit UV-Cinético (Bioclin).

3.2.14. Estudos histológicos

Os animais utilizados no ensaio descrito no item 3.2.13. foram sacrificados, por deslocamento cervical e tiveram o músculo gastrocnêmio retirado para avaliação histológica. Os músculos retirados ficaram por cerca de três horas em solução ALFAC (álcool a 70%; formaldeído e ácido acético 85:10:5, v/v)) para fixação. Após a desidratação, foi realizada a diafanização, que consiste na desidratação do material e diafanização propriamente dita, em

banhos sucessivos de xilol, que deixa o músculo transparente e pronto para receber a inclusão em parafina. Em seguida, é feita a microtomia, a fixação dos cortes em lâminas, desparafinização e coloração com Hematoxilina e Eosina.

O estudo histopatológico foi realizado em colaboração com o Prof. Wagner Ferreira dos Santos, do departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP Ribeirão Preto.

3.2.15. Determinação de parâmetros bioquímicos

Na determinação dos parâmetros bioquímicos foi utilizado o mesmo plasma utilizado na determinação da atividade miotóxica (item 3.2.13).

3.2.15.1. Proteínas Totais

A dosagem de proteínas totais foi feita pelo método do Biureto (Henry et al., 1974). Para isso, 20 µL da amostra (plasma) foram adicionados a 1,0 mL do reagente Biureto (LabTest), misturados e incubados a 37°C durante 10 minutos. As absorbâncias foram mensuradas em 545 nm, acertando o zero com o branco (20 µL de água deionizada e 1,0 mL de reagente Biureto). No padrão são adicionados 20 µL do padrão contido no kit a 1,0 mL de biureto.

A absorbância das amostras é convertida para termos de concentração através da fórmula:

$$\text{Proteína (g/dL)} = \frac{\text{Abs do teste} \times 4}{\text{Abs do padrão}}$$

3.2.15.2. Ureia

Nesse teste, 10 µL da amostra (plasma) são adicionados a 1,0 mL do reagente de Trabalho (LabTest), que contém a enzima uréase, e são transferidos para cubeta termostatzada a 37°C. As absorbâncias são medidas aos 30 e 90 segundos. A diferença das absorbâncias (A_{30} e A_{90}) é utilizada no cálculo dos resultados:

$$\text{Uréia (mg/dL)} = \frac{\text{Abs do teste} \times 70}{\text{Abs do padrão}}$$

3.2.15.3. Gama GT (γ -glutamyltranspeptidase)

Em um tubo adiciona-se 1,0 mL do reagente de Trabalho (LabTest) contendo L- γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida, glicilglicina e azida sódica e 50 μ L da amostra (plasma). O tubo é homogeneizado e transferido para cubeta termostatzada a 37°C. As leituras são realizadas em 405 nm e as leituras feitas em 0 e 2 minutos.

3.2.15.4. Eletroforese de proteínas plasmáticas em gel de agarose

A eletroforese de proteínas séricas foi realizada de acordo com Naoum (1990). Em um filme de agarose (CELMGEL[®]) foram aplicados 0,4 μ L do plasma dos animais, com uma pipeta apropriada (Hamilton). Logo após, este filme foi colocado em um sistema de eletroforese (CELM), com o lado onde foram aplicadas as amostras para o pólo negativo da tampa. Esta foi encaixada ao sistema contendo o tampão Tris pH 9,5, para a realização da corrida por 25 minutos à 90 Volts. Após este tempo, o gel foi corado com Negro de Amido (0,2 % em ácido acético a 5%) por 5 minutos, descorado em ácido acético 5 % por 5 minutos, seco a 60 °C, novamente descorado em ácido acético 5 % e seco a 60 °C. As proteínas foram quantificadas após leitura em densitômetro a 520 nm.

3.2.16. Análise estatística

Os ensaios foram realizados em replicatas ($n = 2$ ou $n = 3$) e os resultados determinados com a média e desvio padrão (SD). Os dados foram avaliados estatisticamente através do programa *GraphPad Prism5* por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tuckey, considerando os resultados de $p < 0,05$ como significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cromatografia de Filtração em Gel *Sephacryl S-200*.

O perfil da filtração molecular da peçonha solúvel de *L. m. rhombeata* em coluna *HiPrep Sephacryl S-200* é apresentado na figura 6. Foram eluídas 11 frações, denominadas LmS-A, LmS-B, LmS-C, LmS-D, LmS-E, LmS-F, LmS-G, LmS-H, LmS-I, LmS-J e LmS-K.

Figura 6. Perfil cromatográfico de 20 mg de peçonha bruta de *Lachesis muta rhombeata* em *HiPrep Sephacryl S-200 HR*. O fracionamento foi realizado em sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10* com coluna de 1,6 x 60,0 cm, equilibrada e eluída com tampão Tris HCl 20 mmol/L, NaCl 0,15 mol/L, pH 7,2. Vazão: 0,5 mL/min. Volume coletado por tubo: 1,5 mL. Temperatura: 25 °C.

A coluna *Sephacryl S-200* é uma coluna de filtração em gel com resina composta de ligações cruzadas entre alil-dextrana e N,N'-bisacrilamida (www.gelifesciences.com/). Esse tipo de coluna permite a separação de proteínas baseada na diferença entre suas massas molares. Portanto, as frações que eluem primeiro são as frações com maior massa molar, pois passam mais rapidamente por entre os poros da resina, já as frações menores percorrem um caminho maior por entre as ligações cruzadas do gel e eluem posteriormente. As amostras são eluídas isocraticamente, ou seja, não há necessidade de usar tampões diferentes e um gradiente de concentração para a separação dos componentes da amostra. O pH do tampão de eluição é de 7,2, pois é o pH próximo ao pH da peçonha (pH 7,0) e evita a desnaturação das enzimas durante e após a cromatografia (SILVA, 2011).

Com as frações obtidas nesse primeiro passo cromatográfico, foi realizada a dosagem de proteínas pelo método da absorbância 280/205 nm (SCOPES, 1974), uma eletroforese em gel de poliacrilamida com agente desnaturante (SDS-PAGE) a 13,5% (Fig. 7) e o teste de hemólise radial indireta em gel de agarose. Este último foi realizado a fim de verificar quais das frações obtidas possuíam atividade fosfolipásica A₂ (Figs. 8A e 8B).

A SDS-PAGE (Fig. 7) mostra que a filtração molecular da peçonha em *Sephacryl S-200* foi eficiente na separação dos componentes da peçonha, visto que as frações revelaram conter apenas de uma a três proteínas relevantes. A fração LmS-G apresentou apenas uma banda eletroforética bastante intensa com massa molar inferior a 20 kDa, consistente com a massa molar de fosfolipases.

Figura 7. Perfil eletroforético das frações obtidas na exclusão molecular em *Sephacryl* em gel desnaturante de poliacrilamida. Gel de resolução a 13,5% e gel de empilhamento a 5% em acrilamida. Condições de corrida: 90V, corrente elétrica de 35 mA, 3W com duração de 1 hora e 40 minutos. **1:** padrão de massa molar (GE cód. 17-0615-01); **2:** padrão de massa molar (Sigma cód. M3913); **3:** LmS-C; **4:** LmS-D; **5:** LmS-E; **6:** LmS-F; **7:** LmS-G; **8:** LmS-H.

Figuras 8. Atividade fosfolipásica pelo teste de hemólise radial indireta, das frações obtidas por filtração molecular da peçonha de *L. m. rhombeata* em coluna *Sephacryl S200*. Foram aplicados 10 µL do pool de cada fração nos poços do gel de agarose.

Tabela 2. Diâmetros dos halos de hemólise das frações obtidas da filtração molecular da peçonha bruta de *L. m. rhombeata* em *Sephacryl S200*.

Amostras	Diâmetro do halo (cm)
Frações LmS-A, -B, -C, -D, -J, -K	0
Fração LmS-E	0,8
Fração LmS-F	0,9
Fração LmS-G	2,6
Fração LmS-H	2,5
Fração LmS-I	2,0
Branco (PBS)	0

A atividade fosfolipásica pode ser determinada direta ou indiretamente. Para a determinação direta é realizada a titulação potenciométrica, em que se determina a redução do pH da mistura, em consequência do aumento de ácidos graxos gerados pela clivagem dos fosfolipídeos. Neste ensaio utiliza-se uma emulsão aquosa de gema de ovo como substrato na presença de desoxicolato de sódio. Já o método indireto, utiliza gema de ovo e eritrócitos de camundongo. Mesmo sendo semiquantitativo, o método da hemólise de eritrócitos é muito sensível e útil na comparação de diferentes frações da peçonha (LEITE, 2007).

Na presença da PLA₂ haverá a degradação dos fosfolipídeos da gema do ovo (contida no gel de agarose), usada como substrato, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídeos que, por

sua vez, irão promover a hemólise dos eritrócitos. Por isso o teste é denominado teste de hemólise radial indireta (LEITE, 2007), visto que a lise dos eritrócitos ocorre por ação dos lisofosfolipídeos, um dos produtos da catálise das PLA₂s .

Como se pode observar nas placas apresentadas nas figuras 8 A e B, as frações LmS-E, LmS-F e, principalmente, as frações LmS-G, LmS-H e LmS-I, apresentaram grandes halos de hemólise, indicando a presença de PLA₂s (Tab. 2). Entre as frações que causaram hemólise, a LmS-G foi a que apresentou o maior diâmetro de halo. Além disso, a fração LmS-G apresentou banda eletroforética intensa e única em SDS-PAGE, sendo, portanto, a fração escolhida para o próximo passo cromatográfico, a fim de obter-se a enzima purificada.

4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (C18) da fração LmS-G.

A fração LmS-G, obtida da filtração em gel na coluna *Sephacryl S200*, apresentou elevada atividade fosfolipásica (Fig. 8B). Esta fração foi, portanto, submetida à cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C18 (Fig. 9), obtendo-se dois pico proteicos principais. Eles foram eluídos com boa resolução e apresentaram picos simétricos, indicando elevado teor de pureza. Estes componentes foram submetidos ao teste de hemólise radial indireta e a fração 2 apresentou elevada atividade fosfolipásica, Esta fração foi então denominada Lmr-PLA₂, por ser uma fosfolipase A₂ isolada da serpente *Lachesis muta rhombeata* (Fig. 10, Tab.3).

Figura 9. Perfil de eluição da fração LmrS-G da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* em coluna de fase reversa C18. O fracionamento foi realizado em sistema FPLC Äkta Purifier UPC-10 com coluna C18 (0,46 x 25 cm, com partículas de 5 µm, Shimadzu), equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1% (Solução A). Vazão: 1 mL/min. A amostra foi eluída com um gradiente segmentado de concentração de acetonitrila, de 0 a 100% de solução B (ACN 80% e TFA 0,1%), representado pela linha azul. Volume coletado por tubo: 0,5 mL.

Figura 10. Atividade fosfolipásica, determinada pelo teste de hemólise radial indireta, das subfrações, obtidas da cromatografia da LmS-G em coluna de fase reversa C18. Controle positivo: 10 μ L de solução peçonha bruta de *L. m. rhombeata* (0,06 mg/mL); Branco: PBS. Nos outros poços foram aplicados 10 μ L das frações 1 ou 2 (Lmr-PLA₂) obtidas da cromatografia da LmS-G.

Tabela 3. Diâmetros dos halos de hemólise das frações obtidas da cromatografia de fase reversa da fração LmS-G.

Amostras	Diâmetro do halo (cm)
Fração 1	0
Fração 2 (Lmr-PLA₂)	2,1
Controle + *	2,5
Branco (PBS)	0

*Peçonha bruta 0,06 mg/mL (10 μ L)

A recuperação da Lmr-PLA₂ e o rendimento em porcentagem de acordo com a atividade hemolítica indireta estão apresentados na tabela 4:

Tabela 4. Recuperação proteica e atividade PLA₂ dos componentes cromatografados no processo de purificação da PLA₂ de *Lachesis muta rhombeata*.

Amostras	Proteína total (mg)	Recuperação proteica (%)	Atividade PLA ₂ Absoluta ^a (µg/mL)	Atividade Relativa
PbLmr	20,00	100,0	2,400	1
LmS-G	1,64	10,9	0,063	38
Lmr-PLA ₂	1,20	6,0	0,040	60

^a Corresponde à concentração da amostra (µg/mL) capaz de produzir um halo de hemólise de 10 mm de diâmetro.

Pode-se observar que à medida que a Lmr-PLA₂ é purificada a concentração da enzima necessária para produzir o halo de hemólise fica menor, o que é esperado, já que na amostra contendo apenas a enzima, sem outros componentes da peçonha, todas as moléculas são ativas. A atividade fosfolipásica absoluta para a peçonha absoluta foi 2,4 µg/mL contra 0,04 µg/mL para a Lmr-PLA₂, representando uma purificação de 60 vezes (Tab.4). Os dados apresentados mostram também que esta enzima corresponde a aproximadamente 6% da peçonha solúvel, mostrando ser um componente importante da mesma. Caso contrário, seria expressa em menores proporções.

Para a purificação das PLA₂s, geralmente são realizados dois ou três passos cromatográficos. Uma combinação entre filtração em gel e troca iônica ou filtração em gel e fase reversa são os protocolos mais usuais. Ketelhut et al. (2003) realizaram a purificação de uma PLA₂ da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu* também utilizando a filtração em gel como primeiro passo de purificação, porém em uma coluna Sephadex G-75, e posterior cromatografia de fase reversa em coluna C18. Da mesma maneira, as PLA₂s das serpentes *B. pauloensis*, *B. alternatus* e *B. pirajai* foram purificadas utilizando inicialmente a filtração em gel e/ou troca iônica seguida de cromatografia de fase reversa (GARCIA-DENEGRI et al., 2010; RODRIGUES et al., 2007; SOARES et al., 2001a).

De Assis et al. (2008) isolaram e determinaram a estrutura primária de uma PLA₂ de *Lachesis stenophrys*. Para o isolamento da proteína foram necessários três passos cromatográficos: uma filtração em gel em *Sephacryl S200* e uma troca aniônica seguida de uma fase reversa em coluna C18.

Na cromatografia de troca iônica, a separação está baseada na interação da fase estacionária com moléculas carregadas presentes na fase móvel. À medida que o gradiente de concentração da fase móvel aumenta, há uma tendência das proteínas ligadas à fase estacionária serem dissociadas e eluírem. Já na fase reversa, há uma interação hidrofóbica entre a amostra e a resina presente na fase estacionária. Para que essa interação seja rompida, são necessárias altas concentrações de solvente orgânico, como acetonitrila (COLLINS et al., 2006).

Algumas proteínas sofrem desnaturação na presença de acetonitrila, perdendo sua atividade. As PLA₂s, por apresentarem até 7 pontes dissulfeto em sua estrutura terciária, são proteínas relativamente estáveis e mantêm sua atividade mesmo após a cromatografia de fase reversa, como foi possível observar na figura 10. Para a fosfolipase A₂ descrita neste trabalho, os passos de fracionamento anteriormente descritos (gel filtração e cromatografia de fase reversa) foram suficientes para a obtenção da enzima pura.

A fração 1 da cromatografia de fase reversa não teve atividade fosfolipásica. Foi realizado o sequenciamento amino terminal inicial desta fração por sequenciador automático e a mesma demonstrou possuir o N-terminal bloqueado. Provavelmente trata-se de uma metaloproteinase (dados não mostrados).

Para avaliar o grau de pureza e estimar a massa molar da Lmr-PLA₂, foi realizada uma SDS-PAGE a 16%. Isso se deve ao fato das fosfolipases A₂ terem massa molar geralmente baixa e o método de Laemmli não apresentar boa resolução para esta faixa de massa molar. Então, foi necessário trabalhar com um ensaio adequado para peptídeos de baixa massa molar, descrito por Schagger e Jagow (1987). Os resultados obtidos são apresentados na figura 11.

Figura 11. Perfil eletroforético da fração Lmr-PLA₂ em SDS-PAGE a 16%. Gel de resolução a 16% e gel de empilhamento a 5% em acrilamida. Condições de corrida iniciais: 31V, 20 mA, 1W; finais: 85 V, 6,6 mA, 1 W, com duração de 4h 30 min. **1:** vazio; **2,3 e 4:** Lmr-PLA₂ **5:** pico LmS-G ; **6:** peçonha bruta de *Lachesis muta rhombeata* 15µL; **7:** peçonha bruta de *Lachesis muta rhombeata* 5µL; **8:** padrão de massa molar (Sigma cód. M3546) **9:** padrão de massa molar (Sigma cód. M3913).

O perfil da eletroforese apresentada na figura 11 demonstra que a PLA₂ apresenta apenas uma banda eletroforética, confirmando a pureza da enzima. Na figura 12 foi plotado o gráfico do logaritmo da massa molar dos padrões versus a distância de migração (em centímetros). De acordo com a equação da reta obtida pelo gráfico, a massa molar estimada para a Lmr-PLA₂ foi de 14,4 kDa.

De acordo com dados de literatura, a massa molar das fosfolipases A₂ varia entre 14 - 21 kDa (FULY et al., 2000; KETELHUT et al., 2003). Outros autores mencionam a massa molar das PLA₂s variando entre 13-16 kDa (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995).

Figura 12. Curva de calibração para estimar a massa molar da PLA₂ purificada em fase reversa. A equação da reta foi determinada pelo plote do log da massa molar dos padrões versus distância de migração (cm). A PLA₂ não reduzida aplicada no poço 3 da figura 11 apresentou migração de 2,1 cm (massa molar calculada: 14,4 kDa), indicada por uma seta preta com linha contínua.

4.3. Espectrometria de massas

Para a determinação precisa da massa molar da fosfolipase A₂, foi realizada a espectrometria de massas da fração Lmr-PLA₂, demonstrada na figura 13.

Figura 13. Espectro de massas da fração Lmr-PLA₂. Massa molar da fração Lmr-PLA₂ determinada por MALDI-TOF, modo linear (1500 a 20000 Da).

No espectro de massas da figura 13 observa-se um pico majoritário com 13,97518 kDa, correspondente à Lmr-PLA₂. A massa molar da enzima não reduzida determinada pela eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS foi de aproximadamente 14,4 kDa; porém, esta técnica fornece apenas uma estimativa da massa molar. Este método é de fundamental importância para avaliar o grau de pureza da enzima durante o processo de purificação. A massa molar determinada pelo método linear corresponde à massa média de todos os isótopos da amostra e não à massa monoisotópica, podendo, portanto diferir em algumas u.m.a. da massa teórica calculada com base na sua composição em aminoácidos. Deve-se também lembrar que há uma redução de 2 Da para cada ponte dissulfeto presente na molécula. A massa molar da enzima pode também ser maior que a predita pela sequência em aminoácidos nos casos de moléculas glicosiladas.

Três PLA₂s básicas já foram isoladas da peçonha da serpente *Lachesis muta*. Duas isoformas pertencem à subespécie *Lachesis muta muta* (LmTx-I e LmTx-II) e uma à subespécie *Lachesis muta rhombeata* (Lmr-TX). As massas molares dessas PLA₂s são

14,245, 14,18 e 14,27 kDa, respectivamente. Todas determinadas por espectrometria de massas (DAMICO et al. 2005, 2012).

Fuly et al. (1997; 2000; 2002) também isolaram duas isoformas de PLA₂s ácidas da peçonha de *Lachesis muta* (LM-PLA₂-I e LM-PLA₂-II), ambas com massa molar aparente de 17 e 18 kDa, estimadas por eletroforese em SDS-PAGE. O autor não menciona qual subespécie está relacionada à obtenção das duas isoformas.

De Assis et al. (2008) isolaram e caracterizaram a primeira PLA₂ da serpente *Lachesis stenophrys* (LsPA-1) e obtiveram a massa molar de 13,87 kDa por espectrometria de massas. A massa molar da Lmr-PLA₂ obtida nesse trabalho se assemelha mais com a massa molar da LsPA-1. O sequenciamento amino-terminal da Lmr-PLA₂ foi realizado para avaliar quais resíduos de aminoácidos são conservados e quais são diferentes entre essas enzimas isoladas.

4.4. Sequenciamento da Lmr-PLA₂

A sequência amino-terminal dos 60 primeiros resíduos de aminoácidos da Lmr-PLA₂, como descrito no item 3.2.7 é apresentada na figura 14.

1	11	21	31	41	51
HLLQFGDLIN	KIARRNGILY	YSFYGCYCGL	GGRGRPQDAT	DRCCFVHDCC	YGKVTGCDPK

Figura 14. Sequência amino-terminal da Lmr-PLA₂.

As PLA₂s geralmente têm cerca de 120 aminoácidos em sua sequência completa. A determinação total desses aminoácidos não pode ser realizada por degradação de Edman, visto que a amplitude dos picos é reduzida a cada ciclo, fato que é agravado para proteínas acima de 5 kDa (WAINAINA et al., 2008; BORDON, 2012). Para determinar a sequência de peptídeos internos por degradação de Edman, seria necessária a clivagem da proteína com proteases sítio-específicas, como tripsina.

Para o sequenciamento completo da Lmr-PLA₂ foi realizada, a redução, alquilação e a tripsinização da proteína. Em seguida os peptídeos obtidos foram fragmentados e analisados por ensaios de espectrometria de massas, tanto por Eletrospray triplo quadrupolo, quanto por MALDI-TOF/TOF, de acordo com o item 3.2.8. Estes ensaios foram realizados em colaboração com o Centro de Química de Proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto.

O espectrômetro de massas é constituído de um analisador, um detector e o sistema para aquisição dos dados. As fontes de ionização mais utilizadas para análise de proteínas são

o *Electrospray* (ESI) ou MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*). Já os analisadores podem ser do tipo quadrupolo, *ion-traps*, *time-of-flight* (TOF), FT-ICR, *orbitrap* e outros. A escolha dos analisadores depende do tipo da amostra e eles podem estar sozinhos ou acoplados (CANTÚ et al., 2008).

O espectro de massas da Lmr-PLA₂ após digestão tripsínica e análise por *Electrospray* (ESI+-Q-TOF-MS) está apresentado na figura 15. A figura demonstra a relação massa/carga ou m/z dos peptídeos obtidos. Esse espectro é denominado de *Peptide mass fingerprinting* ou MS-1.

Figura 15. *Peptide mass fingerprinting* da Lmr-PLA₂ em *Electrospray* triplo-quadrupolo, ESI+-Q-TOF-MS.

Os dados obtidos na figura 15 foram analisados no programa Mascot, que compara as massas dos peptídeos obtidos com as massas de outros peptídeos já depositadas em bancos de dados, como o NCBI.

Com essa análise primária, foi possível deduzir os aminoácidos de alguns dos peptídeos; porém, cada peptídeo, também chamado de íon precursor, foi isolado e fragmentado por colisão com moléculas de gás inerte, que pode ser hélio, nitrogênio ou argônio. Os espectros gerados por essa colisão são chamados de espectros de fragmentação ou MS/MS (CANTÚ et al., 2008).

Na figura 16 observa-se um dos espectros de fragmentação obtidos a partir do íon precursor de 427 Da do *peptide mass fingerprinting*.

Figura 16. Espectro de fragmentação MS/MS referente ao pico de m/z 427 do *peptide mass fingerprinting*. O espectro corresponde à sequência de aminoácidos DAAICFRD nas posições 91 a 98 de aminoácidos.

A análise dos espectros de fragmentação MS/MS pode ser realizada também *in silico*, através do programa Mascot. Nesta análise, os valores dos fragmentos obtidos são comparados com fragmentos depositados em bancos de dados e a comparação se inicia com base nos íons $-b$ e $-y$ mais intensos. A confiabilidade da análise é determinada através do *score*, ou seja, quanto maior o *score* mais confiável a comparação com o banco de dados do programa (CANTÚ et al., 2008).

Mesmo que os dados obtidos pelo programa Mascot sejam confiáveis, é recomendável que a interpretação dos espectros seja feita também manualmente. Essa interpretação é denominada de sequenciamento “*de novo*”.

Os aminoácidos obtidos pelo sequenciamento amino-terminal e pela espectrometria de massas estão apresentados na figura 17.

1	11	21	31	41	51
HLLQFGDLIN	KIARRNGILY	YSFYGCYCGL	GGRGRPQDAT	DRCCFVHDCC	YGKVTGCDPK
61	71	81	91		
KDIYTYSEEN	GAIVCGGDNP	CKKEICECDR	DAAICFRD		

Figura 17. Sequência da Lmr-PLA₂ obtida por degradação de Edman e espectrometria de massas.

A sequência obtida da Lmr-PLA₂ foi alinhada com outras sequências de PLA₂s depositadas em bancos de dados (Figura 18), que apresentaram maior identidade com a enzima deste trabalho: uma PLA₂ de *Lachesis muta* (D3IVZ34) (JIMENEZ et al., 2009), uma PLA₂ de *Lachesis stenophrys* (LSPA-1) (DE ASSIS et al., 2008) e duas isoformas de PLA₂ ácidas (LM-PLA₂ I e II) de *Lachesis muta muta* (FULY et al., 2002). Além disso, foi realizada uma busca na literatura e três PLA₂s básicas de *Lachesis muta*, que não tinham suas sequências depositadas em qualquer banco de dados, foram incluídas no alinhamento (Lm-TX-I, II e Lmr-TX) (DAMICO et al., 2005; 2012).

	1	10	20	30	40	50	60																																																								
Lmr-PLA2	HLLQ	F	G	D	L	I	N	K	I	A	R	R	N	G	I	L	Y	Y	S	F	Y	G	C	Y	C	G	L	G	G	R	G	R	P	Q	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	D	C	C	Y	G	K	V	T	G	C	D	P	K	K					
LSPA-1	HLLQ	F	G	D	L	I	D	K	I	A	G	R	S	G	F	W	Y	Y	G	F	Y	G	C	Y	C	G	L	G	G	R	G	R	P	Q	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	D	C	C	Y	G	K	V	T	G	C	D	P	K	K					
D3IVZ34	.	.	M	Q	F	G	D	L	I	N	K	I	A	R	R	N	G	I	L	Y	Y	S	F	Y	G	C	Y	C	G	L	G	G	R	G	R	P	Q	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	D	C	C	Y	G	K	V	T	G	C	N	P	K	N		
LmTX-I	HLLK	F	N	K	M	I	K	F	E	T	R	K	N	A	I	P	F	Y	A	F	Y	G	C	Y	C	G	W	G	G	R	.	.	.	.	.	.	.	R	C	C	F	V	H	D	C	C	Y	G	K	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
LmTX-II	HLLK	F	N	K	M	I	K	F	E	T	R	K	N	A	I	P	F	Y	A	F	Y	G	C	Y	C	G	W	G	G	R	.	.	.	.	.	.	.	R	C	C	F	V	H	D	C	C	Y	G	K	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
Lmr-TX	HLLK	F	N	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	N	A	I	P	F	Y	A	F	Y	G	C	Y	C	G	W	G	G	R	.	.	.	.	.	.	.	R	C	C	F	V	H	D	C	C	Y	G	K	W	.	.	.	.	.	.	.	.
LM-PLA2-I	HLLQ	F	G	D	L	I	D	K	I	A	G	R	S	G	F	W	Y	Y	G	F	Y	G	C	Y	C	G	L	G	G	R	G	R	P	Q	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	D	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
LM-PLA2-II	HLLQ	F	E	Q	L	I	R	K	I	A	G	R	.	G	F	R	Y	Y	G	F	Y	G	C	Y	C	G	L	G	G	Q	G	R	P	Q	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	D	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			

	70	80	90																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
--	----	----	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Figura 18. Alinhamento da sequência em aminoácidos da Lmr-PLA₂ com as PLA₂s caracterizadas por De Assis et al. (2008) (D3IVZ34), Jimenez et al. (2009) (LSPA-1), Fuly et al. (2000; 2002) (LM-PLA2-I e II) e Damico et al. (2005; 2012) (LmTX-I e II e Lmr-TX) (2005; 2012). Os aminoácidos sombreados em vermelho indicam os resíduos conservados em todas as sequências. Alinhamento realizado com sequências obtidas do programa BLAST (<http://www.uniprot.org/blast>) e feitas pelo programa MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

No alinhamento da figura 18, a PLA₂ isolada neste trabalho (Lmr-PLA₂) demonstrou 96% de identidade com a fosfolipase A₂ da serpente *Lachesis muta* (JIMENEZ et al., 2009), 90% de identidade com a fosfolipase A₂ de *Lachesis stenophrys* isolada por De Assis et al. (2008) e 88 e 82% de identidade com duas isoformas de fosfolipases A₂ ácidas isoladas de *Lachesis muta* por Fuly et al. (2002). Entretanto, a Lmr-PLA₂ apresentou diferenças em alguns aminoácidos, demonstrando ser uma PLA₂ ainda não caracterizada.

Já foram determinadas as sequências completas de mais de 280 PLA₂s, as quais apresentam de 40-99% de identidade sequencial (KINI, 2005), como se observa na região de alta identidade destacada em vermelho na Figura 18. Essas regiões de alta identidade contribuem para a conservação das estruturas secundárias e terciárias das PLA₂s, incluindo a porção N-terminal em hélice (12 aminoácidos) e o sítio de ligação do cálcio, entre os aminoácidos 25-33 (BONFIM et al., 2008; KINI, 1987).

Entre as sequências alinhadas na figura 18, notam-se resíduos de aminoácidos altamente conservados, como a His (H) na posição 48 (posição 47 no alinhamento apresentado na Fig. 18), Asp (D) na posição 49 (posição 48 na Fig. 18) e Tyr (Y) na posição 52 (posição 51 na Fig. 18), que são extremamente importantes para a atividade catalítica de fosfolipases A₂ (KINI, 2005).

Até o momento, todas as PLA₂s de serpentes já sequenciadas possuem o resíduo His48 (posição 47 na Fig. 18) conservado. Segundo Kini (2005), a alquilação desse resíduo leva à perda completa da atividade enzimática e dos efeitos anticoagulantes dessas enzimas. Este aminoácido e o Asp99 (posição 98 na Fig. 18) atuam como aceptores de prótons, facilitando o ataque nucleofílico na posição sn-2 do fosfolípídeo (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

Outro fato importante que se pode observar nesse sequenciamento é que a Lmr-PLA₂ isolada neste trabalho possui o aminoácido aspartato na posição 49 (D49; posição 48 na Fig. 18), que é característico de PLA₂ cataliticamente ativa. O Asp49 juntamente com 3 moléculas de oxigênio presentes nos resíduos Tyr28, Gly30 e Gly32 (posições 27, 29 e 31 na Fig. 18, respectivamente), são responsáveis pela ligação do cálcio, que estabiliza o intermediário da reação e orienta o substrato ao local de hidrólise (SCOTT et al., 1990; VERHEIJ et al., 1980).

Vários efeitos tóxicos causados por PLA₂ de serpentes são descritos na literatura, tais como: miotoxidade, alteração da agregação plaquetária, edema, hemólise, hipotensão, entre outros. Estes efeitos geralmente estão relacionados com a atividade enzimática, mas outros não; como observado para as PLA₂ Lys49, que induzem vários efeitos tóxicos, mas que são cataliticamente inativas (RODRIGUES et al., 2007).

Segundo Kini e Evans (1989), além dos efeitos ocasionados pela atividade enzimática, as PLA₂s possuem efeitos farmacológicos induzidos pela interação de sítios específicos de sua sequência de aminoácidos com várias proteínas e alvos específicos nas células.

Bonfim et al. (2008) isolaram e caracterizaram uma PLA₂ D49 de serpente *Calloselasma rhodostoma* e observaram que a mesma possui atividade miotóxica e edematogênica. Ketelhut et al. (2003) isolaram e caracterizaram isorformas de PLA₂ D49 de serpente *Bothrops jararacussu* e observaram que elas apresentavam atividade miotóxica (porém baixa), atividade hemolítica indireta, anticoagulante e indução de edema.

Fuly et al. (1993) fizeram um *screening* bioquímico e farmacológico com a peçonha da serpente *Lachesis muta*. De acordo com os autores, a peçonha continha alta atividade PLA₂ e pelo menos quatro enzimas estariam relacionadas a essa atividade. Fortes-Dias et al. (1999) isolaram cinco PLA₂s da peçonha de *Lachesis muta*, uma básica e quatro ácidas. Provavelmente duas das isoformas ácidas são as PLA₂s isoladas por Fuly et al. (2000, 2002) e a básica seria a LMTX-I ou II isoladas por Damico et al. (2005) ou no caso da serpente *Lachesis muta rhombeata*, a Lmr-TX (Damico et al., 2012). Esses dados indicam que a Lmr-PLA₂, até o presente estudo, ainda não tinha sido isolada e caracterizada, já que Fortes-Dias et al. (1999) identificaram a presença de quatro PLA₂s ácidas na peçonha, mas apenas duas foram isoladas.

Junqueira-de-Azevedo et al. (2006) realizaram um estudo de transcriptoma da glândula da serpente *Lachesis muta* e revelaram que cerca de 4,7% das sequências identificadas na glândula da peçonha correspondiam a PLA₂s. Além disso, os autores identificaram dois clusters de PLA₂s, LMUT0119C com 25 ESTs (etiquetas de sequências expressas) e LMUT0188C, com 2 ESTs. Curiosamente, a LMUT0119C não apresentou semelhança com nenhuma das PLA₂s até então isoladas e caracterizadas, já a LMUT0188C mostrou semelhança com as LM-PLA₂- I e II, duas PLA₂s básicas.

Em 2008, Sanz e colaboradores publicaram um trabalho sobre a análise do proteoma de uma *Lachesis muta* de Santa Cruz de la Sierra-Bolívia e nenhuma das PLA₂s encontradas nessa análise apresentou semelhança com as PLA₂s isoladas até o momento. Segundo os autores, essas diferenças poderiam estar relacionadas a variações geográficas. Pela análise da sequência amino-terminal inicial encontrada pelos autores, nota-se que a PLA₂ tem alta identidade com a Lmr-PLA₂ isolada pelo nosso grupo, corroborando para o fato de que as diferenças não estariam relacionadas à variação geográfica, mas sim que a Lmr-PLA₂ ainda não havia sido isolada e caracterizada.

A serpente *G.halys* possui 3 PLA₂s homólogas que pertencem ao grupo II. Foram determinadas duas estruturas cristalográficas para as PLA₂s de *G. halys* que são praticamente idênticas entre elas (XU et al., 2003). A figura 20 apresenta uma das estruturas resolvidas.

Figura 20: Estrutura da PLA₂ da serpente *Gloydius halys* (PDB 1M8R). A estrutura consiste em 3 α -hélices e uma folha- β antiparalela (2 segmentos) (XU et al., 2003).

A enzima possui 3 α -hélices, dois segmentos β antiparalelos e a região de ligação do Ca^{2+} . Como a Lmr-PLA₂ possui 78,4% de identidade com a PLA₂ da figura 20, pode-se inferir que a mesma também deverá apresentar estrutura semelhante à determinada para a PLA₂ de serpente *Gloydius halys* (XU et al., 2003).

Como já foi dito, a região de ligação do Ca^{2+} é altamente conservada nessas moléculas, onde o íon está coordenado com seis ou sete ligantes de oxigênio: três obtidos da carbonila dos resíduos Tyr28, Gly30 e Gly 32, dois da carboxila da Asp 49 e dois ou três da molécula de água (XU et al., 2003). A análise da sequência da Lmr-PLA₂ revela que esta enzima possui esses resíduos na sua estrutura.

Pode-se concluir que foi isolada uma nova fosfolipase A₂ da serpente *Lachesis muta rhombeata*, cuja sequência primária foi parcialmente determinada, faltando apenas sua região C-terminal. Nota-se a presença de um aspartato na posição 49 e que resíduos importantes para a atividade catalítica são conservados.

4.5. Determinação do ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico (pI) de uma proteína nada mais é do que o pH que corresponde à carga elétrica igual a zero, ou seja, nesse determinado pH as cargas positivas e negativas da proteína se anulam (NELSON; COX, 2002). O pI é uma característica bioquímica fundamental, pois indica o predomínio de cargas positivas ou negativas da proteína, ou seja, se ela é ácida ou básica.

A focalização isoelétrica é um método que permite a determinação do pI. Para isso, é estabelecido um gradiente de pH através de pequenas moléculas orgânicas ácidas ou básicas (anfólitos) que ficam distribuídos pelo gel ou fita (no caso da eletroforese bidimensional). Quando a proteína é aplicada e há geração de um campo elétrico, e ela migrará para o pH correspondente ao seu pI (NELSON; COX, 2002).

A eletroforese bidimensional é mais sensível e capaz de separar proteínas com a mesma massa molar e diferentes pIs ou proteínas com semelhantes pIs mas com massas molares diferentes (NELSON; COX, 2002).

A Lmr-PLA₂ demonstrou uma única banda de pI 5,46 (Fig. 21). Portanto, a Lmr-PLA₂ está pura e é uma proteína ácida, com predomínio de cargas negativas entre seus aminoácidos, ou seja, nessa amostra não há se identifica a presença de isoformas.

Figura 21. Focalização isoelétrica da Lmr-PLA₂ em gel bidimensional. Anfólitos na faixa de pH 3 a 10. A Lmr-PLA₂ apresentou pI de 5,46.

Duas isoformas de PLA₂s básicas de *Lachesis muta* isoladas anteriormente apresentaram o pI de 8,7 e 8,6. Essas isoformas se diferenciam apenas por uma substituição de Arg₆₅ por Pro₆₅, o que explica a diferença entre os pontos isoelétricos (DAMICO et al., 2005). A PLA₂ Lmr-TX, isolada da *Lachesis muta rombheata*, não teve seu pI determinado,

mas demonstrou ser uma PLA₂ básica de acordo com sua sequência de aminoácidos (DAMICO et al., 2012).

As isoformas isoladas por Fuly et al. (1997, 2002), tiveram seus pIs determinados. A LM-PLA₂-I tem o pI de 4,7 e a LM-PLA₂ tem o pI de 5,4, que se assemelha ao ponto isoelétrico da Lmr-PLA₂. Ao alinhar ambas sequências amino-terminal no programa MultAlin (Figura 21), observou-se que a sequência completa da LM-PLA₂ ainda não foi determinada, mas o sequenciamento amino-terminal inicial demonstra algumas diferenças entre seus aminoácidos, podendo explicar a semelhança de seus pontos isoelétricos.

A PLA₂ de *Lachesis stenophrys* isolada por De Assis (2008), a LsPA-1, não teve seu pI experimentalmente determinado; porém, o pI teórico, determinado pelo programa Protparam, foi de 4,95. O pI teórico analisa apenas os aminoácidos em sua estrutura primária; portanto, pode ter diferenças do valor determinado experimentalmente.

4.6. Ensaio de cinética enzimática da Lmr-PLA₂ através de ensaio colorimétrico

A atividade enzimática das fosfolipases A₂, além das atividades direta e indireta mencionadas acima, podem ser realizadas com substratos radioativos ou cromogênicos. Petrovic et al. (2001) desenvolveram um ensaio em microplacas usando o substrato cromogênico 4-Nitro-3-(*octanoyloxy*)benzoic acid (NOB). Esse substrato já tinha sido usado em ensaios anteriores descritos por outros autores (CHO; KEDZY, 1991); porém, foi adaptado por Petrovic et al. (2001).

Uma variedade de ácidos aciloxinitrobenzóicos é hidrolisada por fosfolipases A₂ de peçonha de serpentes e pancreática. A reação é Ca²⁺-dependente e o controle do pH também é importante para que ocorra a reação (CHO; KÉDZY, 1991).

A reação consiste na hidrólise da ligação éster do substrato 4N₃OBA (NOB) pela fosfolipase A₂, que libera ácido 4-nitro-3-hidroxibenzóico, uma substância cromófora (PETROVIC et al., 2001).

Figura 22: Substrato NOB. Fonte: <http://www.enzolifesciences.com/BML-ST506/nob/>

O ensaio desenvolvido por Petrovic et al. (2001) utilizava um volume final de 200 μL , e neste trabalho o ensaio foi adaptado para um volume final de 260 μL . Para isso, foi feita uma padronização do método adaptado (APÊNDICE A).

As médias das absorvâncias obtidas foram calculadas e os valores de velocidade foram encontrados utilizando a seguinte equação:

$$V = \frac{0,0785 \times abs \times 1000}{60 \times 260}$$

Onde V é a velocidade em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$, e abs é a média das absorvâncias em 425 nm obtidas. Os valores de 1000 e 260 no dividendo e divisor, respectivamente, convertem μL para mL. O valor de 60, no divisor, converte horas para minutos. Essas conversões são necessárias uma vez que o fator de correção 0,0785 possui como unidade $\mu\text{mol}/\text{h}/260\mu\text{L}$ e a velocidade deve ser apresentada em $\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}$.

Figura 23- Efeito da concentração do substrato na velocidade de uma reação catalisada pela Lmr-PLA₂. A atividade enzimática foi estimada pelo aumento da absorbância devido a formação do produto cromogênico Ácido 4-nitro-3-hidroxibenzóico. As leituras de absorbância em 425 nm foram realizadas no leitor de microplacas Sunrise (Tecan).

Analisando o gráfico da figura 23, conclui-se que este exibe uma dependência hiperbólica de V em função de $[S]$, um comportamento típico da cinética de Michaelis-Menten.

A velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis (K_m) foram obtidas utilizando o programa gráfico *GraphPadPrism* 5.0, e equivalem a 1,147 nmol/min/mL e 0,404 mM, respectivamente. Outro parâmetro cinético obtido através do programa foi o $K_{cat} = 0,41 \text{ min}^{-1}$, ou número de *turnover*, e a eficiência catalítica $K_{cat}/K_m = 1,02 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$. A concentração da Lmr-PLA₂ utilizada no ensaio foi de 10 µg/260 µL (2,75 nmol/mL).

Em concentrações relativamente baixas de substrato, a velocidade (V) aumenta quase linearmente com o aumento da concentração de substrato $[S]$. Em concentrações de substrato mais altas, a velocidade aumenta mais lentamente. Por fim um ponto é alcançado, onde o aumento da velocidade tende a ser insignificante à medida que a $[S]$ aumenta. Nessa região de V forma-se um platô que está próximo da velocidade máxima, V_{max} . A constante de Michaelis (K_m) equivale a $[S]$ quando V for metade da V_{max} (NELSON; COX, 2002).

Diz Filho e colaboradores (2009) isolaram 2 isoformas de PLA₂ (PLA₂A e PLA₂B) da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*. A PLA₂A apresentou um discreto comportamento

sigmoidal especialmente em baixas concentrações, com $V_{max} = 7,54$ nmoles/min e $K_m = 2,3$ mM. A PLA₂B apresentou um evidente comportamento Michaelis-Menten, assim como a PLA₂ apresentada neste trabalho, com $V_{max} = 5,33$ nmoles/min e $K_m = 1,72$ mM. Ambos foram determinados em ensaio com o substrato NOB.

Ponce-Soto et al. (2002) isolaram uma nova PLA₂ (Cdcogli III F6) básica de uma crotoxina obtida da peçonha de *C. d. collineatus*. A V_{max} foi estimada em 6,98 nmol/min e o K_m de 1,3 mM, determinadas também com o substrato NOB.

Vishwanath, Kini e Gowda (1988) isolaram várias isoformas de PLA₂s da serpente asiática *Vipera russelli* e determinaram seus parâmetros cinéticos frente a vários substratos, como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol. Segundo Kini e Evans (1989) essas enzimas isoladas por Vishwanath, Kini e Gowda (1988) tiveram diferentes atividades e elas induziram diferentes características e sintomas quando administradas experimentalmente, demonstrando que a especificidade a determinados substratos, mesmo tendo valores de K_m próximos, não necessariamente indicam que as enzimas terão as mesmas atividades.

Comparando os valores encontrados na literatura, observamos que a PLA₂ deste trabalho apresenta um K_m menor do que as PLA₂s analisadas com o mesmo substrato. O K_m menor pode ser um indicativo de maior afinidade pelo substrato, visto que uma menor concentração de substrato foi necessária para alcançar metade da V_{max} . Porém outras constantes são necessárias para confirmar essa hipótese, como a eficiência catalítica (K_{cat}/K_m). Esse parâmetro cinético seria o melhor parâmetro para a comparação entre enzimas (LEHNINGER, 1976). Não há artigos na literatura demonstrando cinética de PLA₂ de *Lachesis muta*.

As informações sobre especificidade a substratos por parâmetros cinéticos têm sido determinadas por vários autores em vários estudos com diferentes enzimas. Esses ensaios contribuem para o entendimento da interação da enzima com o substrato e através de modificações químicas na molécula, podem determinar quais aminoácidos são fundamentais nessa interação (BORDON et al., 2012; GRAMINHO et al., 2012).

4.7. Atividade sobre plaquetas

As peçonhas de serpentes possuem várias toxinas com atividade sobre plaquetas. Entre elas, podemos citar as serinoproteinases, que possuem atividade semelhante à trombina; (BRAUD; BON; WISNER, 2000) componentes não enzimáticos, como as desintegrinas e lectinas, que são capazes de interagir com o fibrinogênio e receptores de plaquetas; (OUYANG; HUANG, 1984) e as PLA₂s que têm uma ação importante na agregação plaquetária (FULY et al., 2004).

Com relação às PLA₂s, estas podem ter um efeito de indução, inibição, ou um efeito bifásico sobre a agregação das plaquetas (FULY et al; 2004). Doley; Zhou e Kini (2010) complementam que as PLA₂s capazes de interferir na agregação plaquetária podem ser classificadas entre A, B e C. A classe A consiste nas PLA₂s que desencadeiam ou induzem a agregação das plaquetas; na classe B estão as PLA₂s que inibem a agregação plaquetária e a classe C corresponde às PLA₂s que possuem um efeito bifásico, ou seja, em uma pequena concentração e pouco tempo de incubação elas induzem a agregação, enquanto que em maiores concentrações e maior tempo de incubação, elas inibem a agregação plaquetária.

Figura 24. Efeito sobre plaquetas das PLA₂s de *Crotalus durissus terrificus* e Lmr-PLA₂. Plasma Rico em Plaquetas (PRP) na presença dos agonistas ADP e Colágeno. PRP com PLA₂ da serpente *Crotalus durissus terrificus* (25 µg) na presença de ADP e Colágeno e PRP com Lmr-PLA₂ (25 µg) na presença de ADP e Colágeno. Os resultados foram expressos pela média ±SD (n=2) da porcentagem de agregação em relação aos controles. Os controles PRP+ADP e PRP+Colágeno foram considerados 100% de agregação. (*) Comparação com o controle ADP (#) Comparação com o controle Colágeno. (***) alteração significativa (p<0,0001). (**ou ##) alteração significativa (p<0,01).

A figura 24 mostra o comportamento de duas PLA₂s distintas sobre a agregação plaquetária na presença dos agonistas ADP e Colágeno. Observa-se que, ao incubar a PLA₂ presente na peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus* ou a Lmr-PLA₂ com o plasma rico em plaquetas (PRP), ambas tiveram um efeito inibitório significativo sobre a agregação plaquetária; porém, a PLA₂ de *Crotalus* teve uma inibição mais significativa do que a Lmr-PLA₂ nas mesmas concentrações.

As plaquetas fazem parte da hemostasia primária, ou seja, são a primeira resposta do organismo frente a uma lesão tecidual. Elas criam uma barreira através de seus agregados para impedir que o sangue extravase dos vasos sanguíneos e auxiliam na ativação da cascata de coagulação, facilitando a geração da trombina e formação da rede de fibrina ao final do processo (FULY, 2004).

O mecanismo ocorre através da ativação da agregação na presença de um agonista. Fisiologicamente, o processo se inicia quando há exposição de colágeno do subendotélio vascular. A partir desse momento, as plaquetas se tornam ativadas e liberam seu conteúdo citoplasmático. Entre as substâncias liberadas pelas plaquetas estão o ADP (adenosina difosfato) e o TXA₂ (tromboxano A₂). O ADP auxilia no processo, ativando outras plaquetas e formando pseudópodes que auxiliam na agregação (FULY, 2004).

As plaquetas presentes no plasma são constituídas em sua maior parte de fosfolipídeos. Esses fosfolipídeos possuem um importante papel na agregação das plaquetas e consequentemente na coagulação sanguínea, pois a quebra do fosfolipídeo leva à liberação de AA (ácido araquidônico), o precursor do TXA₂ e PAF (fator ativador de plaquetas) (OUYANG; HUANG, 1984).

Ouyang e Huang (1984) isolaram três PLA₂ das peçonhas das serpentes *N. naja atra* e *T. mucrosquamatus* e da abelha *Apis mellifera*. Todas tiveram um efeito de indução sobre a agregação plaquetária. As PLA₂s de *N. naja atra* e *Apis mellifera* tiveram um efeito bifásico, ou seja, em concentrações menores que 10 µg/mL elas induziram a agregação, de maneira dose dependente; porém, em concentrações maiores que 20 µg/mL, tiveram uma diminuição da indução. Além disso, os autores demonstraram que a ativação da agregação plaquetária não estava relacionada com as cargas das enzimas, visto que as duas possuíam pontos isoelétricos bem distintos, sendo a PLA₂ de *N. naja atra* básica (pI = 10,5) e a de *Apis mellifera*, ácida (pI = 5,4).

De acordo com os autores, a atividade sobre a agregação aumentava paralelamente à formação de TXB₂ (tromboxano B₂), ou seja, provavelmente as PLA₂s induzem a agregação através de sua atividade enzimática na membrana fosfolipídica das plaquetas, que leva à liberação de ácido araquidônico e formação de tromboxano (OYANG; HUANG, 1984; BRAUD, BON, WISNER, 2000).

PLA₂s que não possuem atividade sobre a agregação, segundo os autores, deveriam pertencer a outro grupo de PLA₂s, como no caso da enzima de serpente *T. gramineus* que não apresentou atividade agregante sobre as plaquetas e não formou TXB₂ de maneira significativa. A atividade das PLA₂s de indução da agregação plaquetária dependeria, então,

da especificidade ao substrato, no caso os fosfolipídeos das plaquetas (CHAP et al., 1977, 1982; OUYANG; HUANG, 1984).

Fuly et al. (2004) isolaram e caracterizaram uma PLA₂ ASP-49 da serpente *Bothrops jararacussu*, a Bthtx-II que foi capaz de induzir a agregação plaquetária de maneira dose dependente e, de acordo com os testes realizados, essa indução de agregação plaquetária estaria relacionada com múltiplas vias de transdução de sinal, como formação de TXA₂ e ativação de proteínas quinase (FULY et al., 2004).

Na figura 24, observamos que a PLA₂ da serpente *Crotalus durissus terrificus* foi capaz de inibir de maneira significativa a agregação plaquetária. Essa enzima corresponde a uma PLA₂ básica, conhecida como subunidade B básica na crotoxina.

A crotoxina é constituída da uma subunidade B, PLA₂ básica e de outra subunidade não tóxica e não enzimática denominada de crotapotina (SOARES et al., 2001b). A crotoxina, em estudos anteriores, revelou ser indutora da agregação plaquetária (LANDUCCI et al., 1994); porém, quando isolada, a subunidade B demonstrou inibir a agregação, como demonstrado na figura 24.

Teixeira et al. (2011) demonstraram que Bpir-PLA₂, uma PLA₂ ácida isolada da serpente *Bothrops pirajai*, apresentou um efeito inibitório sobre a agregação plaquetária no plasma rico em plaquetas na presença de ADP ou colágeno.

Foram sintetizados peptídeos sintéticos da Bpir-PLA₂ e o peptídeo da região C-terminal (C-pep) obteve o mesmo efeito inibitório sobre a agregação plaquetária observado com a enzima nativa. Com isso, os autores destacaram que a região C-terminal das PLA₂s poderia estar relacionada à inibição da agregação plaquetária induzida por estas enzimas. Apesar de o experimento ter demonstrado que a região C-terminal está relacionada à inibição da agregação, os autores não descartam que a atividade enzimática também pode ter uma relação com sua atividade enzimática sobre as plaquetas (TEIXEIRA et al., 2011).

As PLA₂s anteriormente isoladas e caracterizadas da serpente *Lachesis muta*, a LmTX-I e LmTX-II, não foram avaliadas com relação à sua atividade sobre a agregação plaquetária (DAMICO et al., 2005). Já a Lmr-TX, uma PLA₂ básica isolada da *Lachesis muta rhombeata*, teve um efeito inibitório da agregação plaquetária com 15 µg da enzima (DAMICO et al., 2012). Da mesma maneira, a LM-PLA₂, PLA₂ ácida da serpente *Lachesis muta* isolada por Fuly et al. (1997), teve uma inibição significativa da agregação plaquetária, principalmente quando incubada com o agonista colágeno. Segundo os autores, a atividade inibitória estaria relacionada à atividade enzimática da LM-PLA₂.

Kini e Evans (1989) relataram que além da atividade enzimática, outros efeitos

farmacológicos estariam relacionados à inibição da agregação plaquetária, como o aumento de AMP cíclico e a disruptura do citoesqueleto das plaquetas.

Dessa forma, fica evidente que a ação das PLA₂s sobre a agregação plaquetária continua obscura para os pesquisadores e que mais estudos devem ser desenvolvidos, visando melhor esclarecer os mecanismos pelos quais a atividade fosfolipásica pode inibir ou induzir a agregação de plaquetas.

4.8. Indução de edema

Na figura 25 estão apresentados os resultados referentes à porcentagem do aumento da espessura da pata na indução de edema. A indução foi realizada com duas PLA₂s distintas, uma PLA₂ de *Crotalus durissus terrificus* (a subunidade B da crotoxina) e a Lmr-PLA₂. As concentrações utilizadas foram de 5 µg (Fig. 25A) e 25 µg (Fig. 25B) de enzima. A indução de edema foi mensurada através do aumento da espessura da pata nos tempos 0.5, 1, 2, 3, 4 e 5 horas.

Figura 25. Indução de edema pelas PLA₂s de *Crotalus durissus terrificus* e Lmr-PLA₂ nas concentrações de 5 µg (A) e 25 µg (B). A indução de edema foi avaliada pelo aumento da espessura das patas dos camundongos nas doses de 5 µg (A) e 25 µg (B) nos diferentes tempos de 0,5 a 5 horas. Os resultados foram apresentados pela média $\pm$ SD (n=3) da porcentagem de aumento da espessura em relação às medidas iniciais. (*) Aumentos significativamente diferentes das medidas em relação ao controle (Tampão PBS) (p<0,05).

De acordo com os resultados apresentados na figura 25, pode-se observar que a Lmr-PLA₂ induziu edema na concentração 25 µg, porém o aumento da espessura das patas induzido por 5 µg da Lmr-PLA₂ não foi significativo em relação ao controle (Fig. 25A). A

indução de edema pela PLA₂ da *C.d.terrificus* foi maior do que a Lmr-PLA₂ nas concentrações de 5 e 25 µg, porém não houve diferenças significativas entre as duas enzimas na concentração de 25 µg.

O edema é um sintoma clínico muito frequente nos acidentes ofídicos. Ele é caracterizado pelo aumento da inflamação e formação de exsudatos. Há um aumento da permeabilidade vascular através da ação de diferentes mediadores, gerando a passagem de proteínas do plasma através dessa membrana vascular (FERREIRA et al., 2009).

Vishwanath, Kini e Gowda (1987, 1988) descreveram que a indução de edema pelas PLA₂s pode estar relacionada aos processos que promovem a disfunção da membrana celular, tanto pela lise da membrana quanto pela liberação dos lisofosfolídeos e ácidos graxos. Como exemplo, o ácido araquidônico, que leva à formação de prostaglandinas e leucotrienos, que aumentam a permeabilidade vascular e ocasionam o edema. Além disso, outros processos podem estar envolvidos concomitantemente com a indução do edema, como a miotoxicidade ocasionada por algumas PLA₂s.

Estudos anteriores demonstraram que a peçonha da serpente *Lachesis muta rhombeata* foi capaz de induzir edema de maneira dose dependente (SOARES DE MOURA et al., 1998). De forma semelhante, a peçonha bruta de outra subespécie, *Lachesis muta muta*, também foi capaz de induzir edema (FERREIRA et al., 2009).

Além disso, Ferreira et al. (2009), demonstraram que a LmTX-I, PLA₂ básica isolada da serpente *Lachesis muta muta*, teve uma atividade edematogênica significativa através do extravasamento de plasma na pata dos camundongos, porém o mecanismo de indução de edema pela peçonha bruta foi diferente do mecanismo demonstrado pela LmTX-I.

A LmTX-I induziu edema em parte pela ativação de mastócitos e em parte pela formação do ácido araquidônico. Já a peçonha bruta, induziu edema pela participação das bradicininas e óxido nítrico. Isso se deve ao fato de outras enzimas presentes na peçonha também estarem participando da formação de edema, além das PLA₂s.

As enzimas LM-PLA₂-I e II, isoformas de PLA₂s ácidas isoladas da serpente *Lachesis muta* por Fuly et al. (2002) também demonstraram ter atividade edematogênica. O pré-tratamento dos camundongos com indometacina ou dexametasona reduziram significativamente o edema induzido pelas PLA₂s, reforçando a participação da via da ciclooxigenase e ácido araquidônico na formação do edema por essas enzimas.

Estudos anteriores também demonstraram que a subunidade B da crotoxina possui atividade edematogênica significativa (SOARES et al., 2001b), fato que foi comprovado pelos resultados demonstrados na figura 25, em que a concentração de 25 µg/50 µL da mesma

enzima foi capaz de aumentar a espessura da pata em quase 60%.

A diferença significativa indução de edema entre as duas PLA₂s com 5 µg pode estar relacionada ao fato da PLA₂ da serpente *Crotalus* ocasionar uma maior miotoxidade do que a Lmr-PLA₂, contribuindo na formação do edema.

4.9. Miotoxidade

A atividade miotóxica foi realizada através da dosagem de CK (creatina quinase) no plasma de camundongo 3 horas após a injeção das toxinas e do controle. Pode-se observar na figura 26 que a PLA₂ de serpente *Crotalus durissus terrificus* foi capaz de induzir miotoxidade de maneira relevante nas duas doses administradas, enquanto que a Lmr-PLA₂, PLA₂ ácida isolada da serpente *Lachesis muta* não foi capaz de induzir miotoxidade nas duas doses administradas.

Figura 26. Atividade miotóxica através da dosagem de creatina quinase em plasma de camundongos. A dosagem foi realizada após 3 horas de injeção de PBS; PLA₂ de *Crotalus* ou Lmr-PLA₂ nas doses de 25 e 50 µg/animal. Os resultados foram apresentados pela média ±SD (n=3) da porcentagem de aumento da CK em relação ao controle PBS. (***) aumento significativo (p<0,0001).

As PLA₂s encontradas nas peçonhas de serpentes possuem uma ampla variedade de efeitos farmacológicos. As ações variam entre as diferentes PLA₂c ainda que suas estruturas primária, secundária e terciária permaneçam altamente conservadas. Como já citado anteriormente, essas enzimas podem ter atividade neurotóxica, miotóxica, anticoagulante, inibição ou indução da agregação plaquetária, atividade edematogênica, entre outras (DOLEY; ZHOU, KINI, 2010).

Uma peçonha específica pode ter várias isoformas de PLA₂s e cada uma com um efeito farmacológico distinto. Nem todas as PLA₂s possuem todos os efeitos farmacológicos possíveis, ou seja, enquanto uma isoforma pode ter efeito neurotóxico, outra pode ter efeito miotóxico e anticoagulante ou todos concomitantemente. A diferença entre poucos

aminoácidos pode ser responsável pelos efeitos farmacológicos distintos (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

Com relação à miotoxicidade, as PLA₂s podem ter efeitos locais ou sistêmicos. Miotoxinas locais induzem efeitos mionecróticos no local do envenenamento e os sistêmicos causam danos musculares generalizados com mialgia e mioglobínúria. A miotoxicidade sistêmica é característica de serpentes da família Elapidae e de algumas da família Viperidae, como a serpente *Crotalus durissus terrificus* (GOPALAKRISHNAKONE et al., 1997; GUTIÉRREZ et al., 2008).

Segundo Bonfim et al. (2008), as atividades miotóxica e edematogênica não estão relacionadas com a atividade catalítica das Asp49. Acredita-se que atividade miotóxica seja uma consequência indireta da ação das PLA₂s, que conduzem ao aumento da permeabilidade a íons Ca²⁺ e ativação de proteases extracelulares. Além disso, as Asp49 são geralmente menos miotóxicas, apesar de mais ativas enzimaticamente, do que as Lys49 (KETELHUT et al., 2003). Ou seja, o fato da Lmr-PLA₂ ser ativa enzimaticamente não garante que ela tenha efeitos miotóxicos. Porém, segundo Lomonte, Angulo e Calderón (2003), as PLA₂s exercem efeito miotóxico através de sua região C-terminal, que quando carregada positivamente, interage com região negativa das membranas celulares, aumentando a permeabilidade a íons como o cálcio e causando a disruptura das células.

Geralmente, PLA₂s básicas são mais tóxicas e possuem maior efeito miotóxico do que as PLA₂s ácidas. Segundo Kini e Evans (1989) a posição específica das cargas positivas e não o número total dessas cargas seria determinante nas atividades farmacológicas dessas enzimas. Além disso, o autor complementa que a alta homologia estrutural das PLA₂s não garantem que elas tenham o mesmo efeito farmacológico, ou seja, para que duas PLA₂s tenham efeitos farmacológicos semelhantes é necessário que a região responsável por esses efeitos, ou seja, seus sítios farmacológicos, sejam semelhantes.

A LM-PLA₂-I, PLA₂ ácida isolada da peçonha de *Lachesis muta* por Fuly et al. (1997), quando injetada no músculo de camundongos, demonstrou possuir atividade miotóxica. Os autores afirmam que essa atividade está relacionada à atividade enzimática, visto que a alquilação do resíduo de histidina da enzima aboliu a atividade miotóxica. Além disso, os autores demonstram que embora a LM-PLA₂ tenha atividade miotóxica, essa atividade foi bem inferior quando comparada com serpentes de outros gêneros, como as do gênero *Crotalus* por exemplo.

Damico et al. (2005) realizaram um estudo com a peçonha bruta de *Lachesis muta muta* quanto à sua ação neurotóxica e miotóxica. Os autores demonstraram que a atividade

neurotóxica da peçonha dessa serpente sobrepõe à miotóxica, já que, em doses baixas, efeitos neurotóxicos evidentes foram observados, enquanto que com relação à miotoxicidade os efeitos não foram relevantes.

Damico et al. (2006) caracterizaram funcionalmente uma PLA₂ básica, a Lm-TX-I, que demonstrou ser um potente bloqueador neuromuscular pré-sináptico de nervo de galinha, mesmo em concentrações baixas de 1 µg/mL. Além disso, quanto à miotoxicidade, a LmTX-I, apesar de básica, apresentou baixa miotoxicidade, mesmo em altas doses, confirmando que as PLA₂s de *Lachesis* não possuem atividade miotóxica evidente. Estes dados são comprovados pelos resultados observados com a Lmr-PLA₂.

O envenenamento das serpentes do gênero *Lachesis* é bem semelhante ao envenenamento das serpentes do gênero *Bothrops*. Ketelhut et al. (2003) isolaram e caracterizaram quatro isoformas de PLA₂s ácidas da serpente *Bothrops jararacussu*, denominadas de SIIISIIA, SIIPIIB, SIIISPIIA e SIIPIIIB. Essas enzimas possuem pI ao redor de 5,3, massa molar de aproximadamente 15 kDa e apresentaram baixa ou nenhuma atividade miotóxica *in vivo*. Algumas das isoformas tiveram alta atividade hemolítica indireta, demonstrando que a miotoxicidade não estaria relacionada à atividade catalítica. A Lmr-PLA₂, objeto desse trabalho, demonstra ter um perfil farmacológico semelhante ao dessas isoformas isoladas da serpente *Bothrops jararacussu*.

Com relação à subunidade B da crotoxina, estudos anteriores revelaram que esta enzima possui atividade miotóxica local e sistêmica elevada e que essa atividade é demonstrada através da alta quantidade de creatina cinase obtida no plasma após 3 horas de injeção em músculo gastrocnêmio de camundongos. Isso confirma os resultados obtidos e demonstrados na figura 26, onde a PLA₂ de *Crotalus* foi capaz de aumentar a quantidade de creatina cinase de maneira significativa (GUTIERREZ et al., 2008).

4.10. Estudos Histológicos

Os mesmos animais utilizados no ensaio de miotoxicidade (item 4.9) tiveram seus músculos gastrocnêmicos retirados e submetidos a uma análise histológica. Na figura 27 são apresentadas fotomicroscopias de campo claro, representativas destes ensaios.

O envenenamento por serpentes causa inúmeros sintomas decorrentes da ação de suas toxinas sobre as células do organismo. Com relação à miotoxicidade, sabe-se que grande parte das toxinas que atuam sobre células musculares são PLA₂s. Porém, o mecanismo exato da atuação dessas enzimas na musculatura esquelética ainda continua obscuro. Como discutido no item 4.9, sabe-se que há uma atuação tanto por sua atividade enzimática quanto por interações de sua região C-terminal com alvos celulares.

Pode-se observar na figura 27 que a injeção de 25 ou 50 µg de PLA₂ de *C. d.terrificus* induziu significativa mionecrose, confirmando a elevada miotoxicidade desta enzima. Os danos causados são evidenciados pela opacidade das células e destruição das fibras musculares (indicada pela seta da figura 27B), inclusive com desagregação do tecido conectivo (perimísio e endomísio). Observa-se também a migração de células de defesa do organismo, provavelmente células poliformonucleares (seta da figura 27C). Além disso, é evidente a destruição e rompimento de células musculares dessa toxina nestas duas concentrações.

Por outro lado, nos músculos injetados com Lmr-PLA₂, tanto 25 quando 50 µg, nota-se a preservação das fibras musculares com a manutenção da estriação das células, suas bainhas conjuntivas e ausência de mionecrose e células de defesa, indicando que não houve lesão tissular com estas duas concentrações da enzimas. Esses resultados podem ser corroborados por aqueles da dosagem de CK demonstrados na figura 26 item 4.9. Além disso, é possível observar a semelhança entre as figuras 27C e 27D com a 27A, que contém apenas PBS. Estes resultados mostram que a Lmr-PLA₂ não é miotóxica nestas concentrações.

Observa-se, no entanto, que na concentração de 50 µg a Lmr-PLA₂ induz a formação de edema, indicado pelos espaços intracelulares, demonstrado pela seta da figura 27E. Esse resultado corrobora com o resultado demonstrado no item 4.8 figura 25, onde houve formação de edema com a injeção de Lmr-PLA₂ em camundongos.

Figura 27. Estudo de miotoxicidade *in vivo* após 3 horas de injeção de 25 e 50 µg de PLA₂ de *C.d.terrificus* ou Lmr-PLA₂. Fotomicroscopias representativas de músculos gastrocnêmicos corados com hematoxilina e eosina. (A) após injeção de 50 µL de PBS; (B) e (C) após injeção de 25 µg/50 µL e 50 µg/50 µL de PLA₂ de *C .d. terrificus* em PBS, respectivamente; (D) e (E) após injeção de 25 µg/50 µL e 50 µg/50 µL de Lmr-PLA₂ em PBS, respectivamente. As setas indicam, nessa ordem, mionecrose (B), migração de leucócitos (C) e edema na região do perímísio (E). Aumento de 400x.

Fuly et al. (2003) demonstraram a atividade de uma PLA₂ isolada de *Lachesis muta*, a LM-PLA₂-II, sobre a musculatura de camundongo e observaram que a enzima é miotóxica, induzindo lesões mionecróticas e infiltrados leucocitários. A LM-PLA₂ é uma

PLA₂ ácida, com atividade hemolítica indireta e, ao abolirem essa atividade, através da alquilação do resíduo His48 fundamental na atividade catalítica, os autores demonstraram que houve perda da atividade enzimática e miotóxica, indicando assim, que a atividade miotóxica dessa enzima estaria relacionada com a atividade catalítica.

Bregge-Silva et al. (2012) observaram que houve lesão mionecrótica com 100 µg da enzima LAAO (L-aminoácido oxidase) da serpente *Lachesis muta*, demonstrando que não apenas as PLA₂s são responsáveis pela miotoxicidade da peçonha dessa espécie, mas que outras toxinas da peçonha contribuem para este efeito.

Damico et al. (2005) observaram através de seus estudos que a peçonha da serpente *Lachesis muta* tem uma atividade neurotóxica preponderante à atividade miotóxica. Como discutido no item 4.9, essa atividade neurotóxica é atribuída às PLA₂s. Enquanto algumas PLA₂s têm como função a miotoxicidade, outras podem ter um efeito neurotóxico ou edematogênico. Isso poderia explicar a ausência de miotoxicidade da Lmr-PLA₂. Possivelmente, a Lmr-PLA₂ teria outra função no envenenamento, que não a miotóxica.

Com relação à PLA₂ da *C.d.terrificus*, esta é uma enzima básica e com intensa miotoxicidade, já demonstrada por estudos anteriores (GUTIÉRREZ et al., 2008). Como já discutido no item 4.9, as PLA₂s básicas possuem efeito miotóxico mais significativo do que as PLA₂s ácidas. Isso se deve, de acordo com vários estudos e análises estruturais (Lomonte, Angulo e Calderon, 2003), à região C- terminal dessas enzimas que são carregadas com resíduos básicos e interagem diretamente com células musculares, causando a ruptura das mesmas.

Não foi possível determinar a região C-terminal da Lmr-PLA₂, porém sabe-se que é uma PLA₂ ácida com predomínio de resíduos negativos na sua estrutura. Possivelmente essa enzima não possui o C-terminal carregado positivamente.

4.11. Parâmetros bioquímicos

Visando avaliar a toxicidade da PLA₂, foram determinados os níveis séricos de Gama GT, ureia, proteínas totais e suas frações eletroforéticas (Fig. 28 e Tab.5) de camundongos injetados com duas doses da enzima (25 e 50 µg/20 g). Estes estudos foram realizados também com a PLA₂ da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, considerada um dos seus componentes mais tóxicos.

Figura 28. Parâmetros bioquímicos após 3 horas de injeção de 25 e 50 µg de PLA₂ de *C.d.terrificus* ou Lmr-PLA₂. (A) Proteínas totais plasmáticas; (B) Gama GT plasmática; (C) Ureia plasmática. Observação: não houve diferenças significativas com relação ao controle (n = 3).

Tabela 5. Níveis de proteínas plasmáticas após 3 horas de injeção de salina (controle), PLA₂ de *C.d.terrificus* e Lmr-PLA₂ em 25 e 50 µg, respectivamente.

Amostra	N ¹	Albumina (%) ²	Alfa-1 (%) ²	Alfa-2(%) ²	Beta-1 (%) ²	Beta-2 (%) ²	Gama (%) ²
Controle	3	57.83 ± 2.02	7.25 ± 0.27	8.20 ± 0.94	6.05 ± 0.22	15.02 ± 1.76	4.73 ± 0.90
Cd 25 µg	3	54.67 ± 1.02	9.47 ± 1.67	7.10 ± 0.58	7.80 ± 0.32	15.83 ± 0.38	5.13 ± 1.23
Cd 50 µg	3	57.43 ± 0.82	7.27 ± 0.73	7.80 ± 0.50	6.53 ± 0.66	15.97 ± 0.34	5.03 ± 0.22
Lm25 µg	3	52.90 ± 3.01	8.43 ± 0.32	7.90 ± 0.75	9.20 ± 1.81	16.70 ± 0.00	4.83 ± 0.70
Lm 50µg	3	51.73 ± 1.04	9.37 ± 0.20	10.60 ± 0.55	8.30 ± 0.32	16.57 ± 0.24	3.43 ± 0.75

¹ Número de animais por grupo

² Porcentagens de proteínas plasmáticas estimadas por análise densitométrica, representada pela Média ± Erro Padrão da Média.

Até o momento, poucos estudos foram realizados sobre a análise de parâmetros bioquímicos nos envenenamentos. Pardal et al. (2007) fizeram um relato de caso de acidente laquético e realizaram alguns exames como hemograma completo, provas de coagulação, enzimas hepáticas, uréia, creatinina e glicemia. Os resultados demonstraram que o paciente teve as provas de coagulação alteradas, bem como aumento de ureia.

Da mesma maneira, Jorge et al. (1997), descreveram um caso clínico de acidente laquético e fizeram análises bioquímicas, como provas hepáticas, glicemia, gama GT, CK e análises hematológicas. Houve alterações nas análises hematológicas e provas de coagulação, além de aumento de CK.

De acordo com a figura 28, nota-se que não houve diferenças significativas com relação às proteínas totais, Gama GT, Ureia e frações de proteínas plasmáticas, na injeção de PLA₂ de *C.d.terrificus* e Lmr-PLA₂ nas duas concentrações.

A análise de proteínas totais é fundamental com relação ao processo inflamatório. Há uma diminuição acentuada da síntese de albumina nesses casos. Além disso, há a diminuição de proteínas negativas de fase aguda, que tem uma queda no início do trauma (BARRAVIERA, 1994; CREMONEZ, 2011). No acidente ofídico, portanto, é comum que haja uma diminuição do valor de proteínas totais no início do envenenamento, fato que não foi observado com a injeção das toxinas isoladas. No entanto, é importante salientar que estes dados foram obtidos apenas 3 horas após o envenenamento. É possível que algumas destas alterações só sejam detectadas mais tardiamente.

A análise das frações proteicas (Tab.5) demonstra que não houve diferenças significativas entre as frações onde foi injetado controle (salina) e as frações com as toxinas

isoladas. Desta maneira, pode-se observar que as PLA₂s não levaram ao aumento de inflamação ou o tempo foi insuficiente para que houvesse aumento significativo das frações que são elevadas em caso de inflamação aguda.

A enzima Gama GT (Gama glutamil transferase) é uma enzima hepática que indica lesão aguda no fígado. Na figura 28 nota-se que não houve aumento dessa enzima com relação à Lmr-PLA₂, fato que já tinha sido observado nos envenenamentos laquéticos (PARDAL et al., 2007).

O aumento da ureia é observado nos casos de envenenamento laquético (CARDOSO, 2009). Cremones (2011) observou que houve aumento de ureia nas primeiras horas de administração de peçonha bruta de *Lachesis muta rhombeata* em ratos. Segundo a autora, esse fato se deve, provavelmente, ao depósito de microcoágulos nos rins dos animais, pela ação de serinoproteínases da peçonha. A ureia é normalizada após 24h de injeção da peçonha.

A figura 28 demonstra que não houve um aumento de Ureia significativo na injeção das toxinas com relação ao controle. Esse fato sugere que a Lmr-PLA₂ não tem ação direta nos rins. Outro fato que pode ter contribuído neste resultado é a dosagem de ureia ter sido realizada em plasma após 3 horas de injeção. Deste modo, o tempo de ação da PLA₂ pode ter sido insuficiente para causar lesões significativas.

Um estudo de Takasaki et al. (1998) demonstraram que anticorpos contra PLA₂s produzidas na isquemia e reperfusão levaram à uma diminuição da injúria renal e sugerem que as PLA₂s provavelmente tem um papel fundamental na lesão renal. De acordo com os autores, o aumento de ureia e a lesão renal se devem ao fato das PLA₂s serem moléculas promotoras da inflamação, com liberação de ácidos graxos e lisofosfolípidos precursores de ácido araquidônico e eicosanoides.

Os resultados obtidos nestes ensaios com a Lmr-PLA₂ indicam que a mesma apresenta baixa toxicidade, pelo menos nas concentrações e tempo analisados, o que é muito bom quando se considera sua possível aplicação terapêutica.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

No presente trabalho isolamos e caracterizamos bioquímica e funcionalmente uma nova fosfolipase A₂ da peçonha da serpente *Lachesis muta rhombeata*, denominada Lmr-PLA₂.

A Lmr-PLA₂ foi isolada através de dois passos cromatográficos: uma filtração em gel, seguida de fase reversa em coluna C18. Esses dois passos cromatográficos foram suficientes para a obtenção da enzima pura, fato que foi comprovado pelo gel de SDS-PAGE e pela espectrometria de massas. Com a espectrometria foi possível determinar que a massa molar da Lmr-PLA₂ é 13,97 kDa.

O ponto isoelétrico foi determinado por eletroforese bidimensional, demonstrando que a Lmr-PLA₂ tem o pI de 5,46 e é, portanto, considerada uma PLA₂ ácida. Com o sequenciamento, notou-se que a Lmr-PLA₂ possui semelhança com outras fosfolipases de *Lachesis*, mas possui resíduos diferentes em sua sequência, o que a caracteriza como uma nova PLA₂.

Os parâmetros cinéticos foram obtidos com o substrato NOB (4N₃OBA). A velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis (K_m) equivalem a 1,147 nmol/min/mL e 0,404 mM, respectivamente. Outro parâmetro cinético obtido foi o $K_{cat} = 0,41 \text{ min}^{-1}$, ou número de *turnover*, e a eficiência catalítica $K_{cat}/K_m = 1,02 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$. A Lmr-PLA₂ é a primeira fosfolipase de *Lachesis* que tem seus parâmetros cinéticos determinados. A determinação desses parâmetros é fundamental para análise de eficiência catalítica e especificidade a substratos.

Com relação às atividades biológicas, a Lmr-PLA₂ demonstrou inibir a agregação plaquetária, porém de maneira pouco significativa; demonstrou ser edematogênica, porém também de maneira pouco significativa e demonstrou não ter atividade miotóxica através da dosagem de CK e análise histológica.

Além disso, foram determinados parâmetros bioquímicos no plasma de camundongos que tiveram injeção de Lmr-PLA₂, que não demonstraram diferenças significativas com relação ao controle.

Dessa forma, concluímos que a Lmr-PLA₂ é uma fosfolipase ácida de baixa toxicidade, quando comparada com outras PLA₂s, fato demonstrado através da baixa miotoxicidade e formação de edema apenas em maiores concentrações.

A baixa toxicidade é uma vantagem da Lmr-PLA₂ e permite que essa enzima possa ser utilizada no delineamento de novos fármacos. Além disso, o fato de não ser tóxica mesmo

tendo semelhança com as PLA₂s tóxicas contribui para o estudo da relação estrutura-função dessas proteínas, através do estudo das diferenças entre suas sequências e como elas atuam nos receptores e membranas celulares.

REFERÊNCIA

6. REFERÊNCIAS

ANGULO, Y.; GUTIERREZ, J.M.; SOARES, A.M.; CHO, W.; LOMONTE, B. Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A(2) homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation, **Toxicon**, v.46, p.291–296, 2005.

ARAGÓN-ORTIZ, F.; BRENES-BRENES, J.R.; GUBENSEK, F. Characterization of a lectin-like protein isolated from *Lachesis muta* venom. **Revista de Biología Tropical**, v.37, p.78-83, 1989.

ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A₂ – A structural review. **Toxicon**, v.34, p.827-841, 1996.

BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas, 1994.

BERG, O.G.; GELB, M.H.; TSAI, M.D.; JAIN, M.K. Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A₂-paradigm. **Chemical Reviews**, v.101, p.2613-2654, 2001.

BÉRNILS, R.S.; COSTA, H.C. **Brazilian reptiles**: List of species (2011). Disponível em : <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acesso em 08/12/2012. 2011.

BONFIM, V.L.; PONCE-SOTO; L.A.; MARTINS DE SOUZA, D.; SOUZA, G.H.M.F.; BALDASSO, P.A.; EBERLIN, M.N.; MARANGONI, S. Structural and functional characterization of myotoxin, Cr-IV 1, a phospholipase A₂ D49 from the venom of the snake *Calloselasma rhodostoma*. **Biologicals**, v.36, p.168-176, 2008.

BORDON, K.C.F. **Caracterização funcional e estrutural da hialuronidase isolada da peçonha de serpente *Crotalus durissus terrificus***. 2012. 123f. (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto.

BOWTON, D.L.; DMITRIENKO, A.A.; ISRAEL, E.; ZEIHNER, B.G.; SIDES, G.D. Impact of a soluble phospholipase A₂ inhibitor on inhaled allergen challenge in subjects with asthma. **Journal of Asthma**, v. 42, p. 65-71, 2005.

BRADLEY, J.D.; DMITRIENKO, A.A.; KIVITZ, A.J.; GLUCK, O.S.; WEAVER, A.L.; WIESENHUTTER, D.; MYERS, S.L.; SIDES, G.D. A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial of LY333013, a selective inhibitor of group II secretory phospholipase

A₂, in the treatment of rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 32, p. 417-423, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Acidentes por serpentes**. Brasília, DF. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/texto/5817/783/acidentes-porserpentes.html>>. Acesso em: 12 de agosto de 2012.

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

BREGGE-SILVA, C.; NONATO, M.C.; ALBUQUERQUE, S.; HO, P.L.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I.; DINIZ, M.R.V.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; ARANTES, E.C. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, v.60, p.1263-1276, 2012.

BURKE, J.E.; DENNIS, E.A. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, v.50, p.237-242, 2009.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The Venomous Reptiles of Latin America**. Cornell University Press. Ithaca. NY, 1989.

CANTÚ, M.D.; CARRILHO, E.; WULFF, N.A.; PALMA, M.S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v.31, p.669-675, 2008.

CARDOSO, J.L.C. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo- SP: Savier, 2009.

CARVALHO, C.D. **Ação do extrato bruto etanólico da *Cabernaemonlana catharinensis* e de seu alcalóide isolado sobre as atividades de fosfolipase A₂ ofídicas em preparação neuromuscular de camundongos**. 2011. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, 2011.

CHANDRA V.; KAUR P.; SRINIVASAN A.; SINGH T.P. Three-dimensional structure of a presynaptic neurotoxic phospholipase A₂ from *Daboia russelli pulchella* at 2.4 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.296, 1117–1126, 2000.

CHAP, H.; ZWALL, R.F.A.; VAN DEENEN, L.L.M. Action of highly purified phospholipases on blood platelets. Evidence for an asymmetric distribution of phospholipids in the surface membrane. **Biochemical and Biophysical Acta**, v. 467, p.146, 1977.

CHAP, H.; PERRET, B.; MAUCO, G.; PLANTAVID, M.; LAFFONT, F.; SIMON, M.F. DOUSTE-BLAZY, L. Organization and role of platelet membrane phospholipids as studied with phospholipases A₂ from various venoms and phospholipases C from bacterial origin. **Toxicon**, v.20, p.291, 1982.

CHO, W.; KEZDY, F.J. Chromogenic Substrates and Assay oh Phospholipases A₂. **Methods in Enzymology**, v.197, p.75-79, 1991.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

COMINETTI, M.R; PONTES, C.L.S; SOUZA, D.H.F. Métodos cromatográficos e critérios de pureza. In: SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S; SOUZA, D.H.F. **Métodos em Toxinologia: toxinas de serpentes**. São Carlos: EduFSCar, 2007. p.11-23.

CORPET, F. Multiple sequence aligment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p.10881-10890, 1988.

CORRÊA, L.C.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; CINTRA, A.C.O.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; FONTES, M. R.M. Crystal structure of a myotoxic Asp-49-phospholipase A₂ with low catalytic activity: Insights into Ca²⁺ - independent catalytic mechanism. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1784, p. 591-599, 2008.

CREMONEZ, C.M. **Estudo da ação antiofídica do extrato das folhas e do suco de graviola (*Annona muricata*) no envenenamento por *Lachesis muta rhombeata***. 2011. 123f. (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto.

DAMICO, D.C.S.; LILLA, S.; DE NUCCI, G.; PONCE-SOTO, L.A. WINCK, F.V.; NOVELLO, J.C. Marangoni, S. Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp49 phospholipase A₂ isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, p. 75–86, 2005.

DAMICO, D.C.S.; BUENO, L.G.F.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S.; MARIA ALICE DA CRUZ-HOFLING, M. A.; NOVELLO, J.C. Functional characterization of a basic D49 phospholipase A₂ (LmTX-I) from the venom of the snake *Lachesis muta muta* (bushmaster). **Toxicon**, v.41, p. 759-765, 2006.

DAMICO, D.C.S.; VASSEQUI-SILVA, T.; TORRES-HUACO, F.D.; NERY-DIEZ, A.C.C.; DE SOUZA, R.C.G.; DA SILVA, S.L.; VICENTE, C.P. MENDES, C.B.; ANTUNES, E.; WERNECK, C.C.; MARANGONI, S. LmrTX, a basic PLA₂ (D49) purified from *Lachesis muta rhombeata* snake venom with enzymatic-related antithrombotic and anticoagulant activity. **Toxicon**, v.60, p.773-781, 2012.

DANIELLE, J.J.; BIANCO, I.D.; FIDELIO, G.D. Kinetic and pharmacological characterization of phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi* venom. **Archives Biochimie et Biophysique**, v.318, p.65-70, 1995.

DANIELLE, J.J.; BIANCO, I.D.; DELGADO, C.; BRIONES CARRILO, D.; FIDELIO, G.D.A. A new phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedi* (yarara chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**, v.35, p.1205-1215, 1997.

DE ASSIS, E.B.; ESTEVÃO-COSTA, M.I.; DO CARMO, V.A.; SILVA-NETO, A.; AGOSTINI, C.G.; ALVARENGA, M. M.; RICHARDSON, M.; FORTES-DIAS, C.L. Purification and complete primary structure of the first PLA₂ from *Lachesis stenophrys* (the Central American Bushmaster) snake venom. **The protein journal**, v.27, p.327-333, 2008.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.13057-13060, 1994.

DENNIS, E.A. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. **Trends Biochemical Sciences**, v.22, p.1-2, 1997.

DIZ FILHO, E.B.S.; MARANGONI, S.; TOYAMA, D.O.; FAGUNDES, F.H.R.; OLIVEIRA, S.C.B.; FONSECA, F.V.; CALGAROTTO, A.K.; JOAZEIRO, P.P.; TOYAMA, M.H. Enzymatic and structural characterization of new PLA₂ isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**, v.53, p.104-114, 2009.

DOLEY, R.; ZHOU, X.; KINI, M. Snake Venom Phospholipase A₂ Enzymes. In: Mackessy, S. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. 1 ed. Taylor & Francis, 2010, p.173-205.

DOS SANTOS, J.I.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **Journal of Structural Biology**, v.167, p.106-116, 2009.

EDMAN, P.; BEGG, G., A protein sequenator. **European Journal of Biochemistry**, v.1, p.80-91, 1967.

FERNANDES, D.S.; FRANCO, F.L.; FERNANDES, R. Systematic revision of the genus *Lachesis* Daudin, 1803 (serpentes, Viperidae). **Herpetologica**, v.60, p.245-260, 2004.

FERREIRA, T.; CAMARGO, E.A.; RIBELA, M.T.C.P.; DAMICO, D.C.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LANDUCCI, E.C.T. Inflammatory oedema induced by *Lachesis muta muta* (Surucucu) snake venom and LmTX-I in the rat paw and dorsal skin. **Toxicon**, v.53, p. 69-77, 2009.

FORTES-DIAS, C.L.; JANNOTTI, M.L.; FRANCO, F.J.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C.R. Studies on the specificity of CNF, a phospholipase A₂ inhibitor isolated from the blood plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). I. Interaction with PLA₂ from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, v.37, p. 1747-1759, 1999.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J.L.C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2.ed. São Paulo: Savier, 2009. p.81-95.

FULY, A.L.; FRANCISCHETTI, I.M.; ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R. Partial purification and some physicochemical properties of phospholipases A₂ from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.26, p.459-463, 1993.

FULY A.L.; MACHADO, O.L.T.; ALVES, E.W.; CARLINI, C.R.S. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A₂ isolated from the venom of *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Thrombosis and Haemostasis**, v.78, p.1372-1380, 1997.

FULY, A.L.; CALIL-ELIAS, S.; ZINGALI, R.B.; GUIMARÃES, J.A.; MELO, P.A., Myotoxic activity of na acidic phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Toxicon**, v.38, p.961-972, 2000.

FULY, A.L.; DE MIRANDA, A.L.P.; ZINGALI, R.B.; GUIMARÃES, J.A. Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, v.63, p.1589-1597, 2002.

FULY, A.L.; CALIL-ELIAS, S.; MARTINEZ, A.M.B.; MELO, P.A.M.; GUIMARÃES, J.A. Myotoxicity induced by an acid Asp49 phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* snake venom. Comparison with lysophosphatidylcoline. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.35, p.1470-1481, 2003.

FULY, A.L.; SOARES, A.M.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; GUIMARÃES, J.A. Signal Transduction Pathways in the Platelet Aggregation induced by a D-49 Phospholipase A2 Isolated From *Bothrops jararacussu* Snake Venom. **Biochimie**, v.86, p. 731-739, 2004.

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

GOPALAKRISHNAKONE, P. Myotoxic phospholipases from snake venoms: general myoglobinuric and local myonecrotic toxins. **Toxicon**, v.35, p.474-474, 1997.

GOUET, P.; COURCELLE, E; STUART, D.I.; METOZ, F. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, v.15, p.305-308, 1999.

GRAMINHO, E.R.; DA SILVA, R.R.; CABRAL, T.P.F.; ARANTES, E.C.; DA ROSA, N.G.; JULIANO, L.; OKAMOTO, D.N.; GONÇALVES, L.C.; KONDO, M.Y.K.; JULIANO, M.A.; CABRAL, H. Purification, Characterization, and Specificity Determination of a New Serine Protease Secreted by *Penicillium waksmani*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 201-214, 2012.

GRAHAM, R.L.; GRAHAM, C.; MCCLEAN, S.; CHEN, T.; O'ROURKE, M.; HIST, D.; THEAKSTON, D.; SHAW, C. Identification and functional analysis of a novel bradykinin inhibitory peptide in the venoms of New World Crotalinae pit vipers. **Biochemical and Biophysical Research Community**, v.338, p.1587-1592, 2005.

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

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v.33, p.1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A₂: Comparison between crotoxin, crotoxin B and Lys49 PLA₂ homologue. **Toxicon**, v.51, p. 80-92, 2008.

HARVEY, A.L. OVERVIEW. In: LIMA, M.E.de et al. **Animal Toxins: State of the Art; Perspectives in Health and Biotechnology**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2009. p. 19-22.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J.W. **Clinical chemistry: principles and technics**. 2.ed. New York, Harper & Row, 1974.

JABEEN, T.; SINGH, N.; SINGH, R.K.; JASTI, J.; SHARMA, S.; KAUR, P.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T.P. Crystal structure of a heterodimer of phospholipase A₂ from *Naja naja sagittifera* at 2.3 Å resolution reveals the presence of a new PLA₂-like protein with a novel cys 32-Cys 49 disulphide bridge with a bound sugar at the substrate binding site. **Proteins**, v.62, p. 329–337, 2006.

JASTI, J.; PARAMASIVAM, M.; SRINIVASAN, A.; SINGH T.P. Structure of an acidic phospholipase A₂ from Indian saw-scaled viper (*Echis carinatus*) at 2.6 Å resolution reveals a novel intermolecular interaction. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v.60, p.66–72, 2004.

JIMENEZ, K.L.; ZAVALA, A.I.; IZAGUIRRE, V.L.; YARLEQUE A. Cloning and molecular characterization of a phospholipase A₂ cDNA from *Lachesis muta* venom gland. Submitted (JUN-2009) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

JORGE, M.T.; SANO-MARTINS, I.S.; TOMY, S.C.; CASTRO, S.C.; FERRARI, R. A.; RIBEIRO, L. A.; WARRELL, D. A. Snakebite by the bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: case report and review of the literature. **Toxicon**, v.35, p.545-554, 1997.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO L.L.; CHING A.T.; CARVALHO E.; FARIA F.; NISHIYAMA MY J.R.; HO P.L.; DINIZ M.R. *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: implications for snake toxin repertoire evolution. **Genetics**, v. 173, p. 877-889, 2006.

KANG, T.S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M.T.; SINHA, M.; KUMAR, R.P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R.K.; SINGH, T.P.; KINI, R.M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS journal**, v.278, p.4544-4576, 2011.

KETELHUT, D. F. J.; HOMEM DE MELO, M.; VERONESE, E. L.G.; ESMERALDINO, L. E.; MURAKAMI, M.T.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R.; CINTRA, A.C.O.; SAMPAIO, S.V. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A₂ isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v.85, p.983-991, 2003.

KHAN, M.A. **Snake venom PLA₂ bioinformatic approach**. Tese, Singapore: National University of Singapore, 2002.

KINI, R.M.; IWANAGA, S. Structure-function relationships of phospholipases. II. Charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. **Toxicon**, v.24, p.895–905, 1986.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A₂. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.1402–1407, 1987.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. A Model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, v.27, p.613–635, 1989.

KINI, R.M. Venom phospholipase A₂ enzymes, Structure, Function and Mechanisms. **Wiley**, 1997.

KINI, R.M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v.45, p.1147–1161, 2005.

KINI, R.M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochemical Journal**, v.397, p.377–387, 2006.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v.68–69, p.3–58, ago. 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680, 1970.

LANDUCCI, E.C.T.; CONDINO-NETO, A.; PEREZ, A.C.; HYSLOP, S.; CORRADO, A.P.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Crotoxin induces aggregation of human washed platelets. **Toxicon**, v.32, p.217–226, 1994.

LEHNINGER, A.L. **Bioquímica: enzimas**. São Paulo: Edgar Blücher, 1976, p. 90–211.

LEITE, R.S. Atividade fosfolipásica de toxinas. In: SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; SOUZA, D.H.F. **Métodos em Toxinologia: toxinas de serpentes**. São Carlos: EduFSCar, 2007. p. 53–60.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDEROÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v.42, p. 885–901, 2003.

MADRIGAL, M.; SANZ, L.; FLORES-DÍAZ, M.; SASA, M.; NUÑEZ, V.; ALAPE-GIRÓN, A. CALVETE, J. J. Snake venomomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. **Proteomics**, v.77, p.280-297, 2012.

MAGALHÃES, H.P.B.; MAGALHÃES, A.; JULIANO, L.; NELSON, D.L.; ROGANA, E. Mechanism of action and determination of the best substrate for a thrombin like enzyme from *Lachesis muta muta* venom by regression analysis of the kinetic parameters determined with peptidyl p nitroanilide substrates. **Toxicon**, v.47, p.453-458, 2006.

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

MARQUES, M.M.A.; HERING, S.; CUPO, P. Acidente crotálico. In: CARDOSO, J.L.C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2.ed. São Paulo: Savier, 2009. p. 96-101.

MELGAREJO, A.R. Serpentes Peçonhentas no Brasil. In : CARDOSO, J.L.C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2.ed. São Paulo: Savier, 2009. p.42-70.

MODESTO, J.C.A.; SPENCER, P.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R.C.; OLIVA, M.L.; DA SILVA, M.B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; GUARNIERI, M.V.; BE-I-PLA2: A novel acidic phospholipase A₂ from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inducer of prostaglandin I₂ release by endothelial cells. **Biochemical Pharmacology**, v.72, p.377-384, 2006.

NAOUM, P.C. **Eletroforese: técnicas e diagnósticos**. São Paulo, Santos, 1990, p. 18-24.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. Ed. Savier, 3ª Ed., 2002 – SP.

NEVALAINEIN, T.J.; GRAHAM, G.G.; SCOTT, K.F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂. Review. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1781, p.1-9, 2008.

NISEBOM, H.E.; SEKI, C.; VIDAL, J.C. Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon**, v.24, p.259-272, 1986.

OTERO R.; FURTADO M.F.D.; GONÇALVES R.C.; NÚÑEZ V.; GARCÍA M.E.; OSORIO R.G.; ROMERO, M.; GUTIERREZ, J.M. Comparative study of the venoms of three subspecies of *Lachesis muta* (bushmaster) from Brazil, Colombia and Costa Rica. **Toxicon** v.36, p.2021-2027, 1998.

OUYANG, C.; HUANG, T. Effect of the purified phospholipases A₂ from snake and bee venoms on rabbit platelet function. **Toxicon**, v.22, p.705-718, 1984.

PARDAL, P.P.O.; BEZERRA, I.S.; RODRIGUES, L.S.R.; PARDAL, J.S.O.; de FARIAS, P.H.S. Acidente por surucucu (*Lachesis muta muta*) em Belém-Para: A case report. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, p.37-42, 2007.

PETROVIC, N.; GROVE, C.; LANGTON, P.E.; MISSO, N.L.A.; THOMPSON, P.J. A simple assay for a human serum phospholipase A₂ that is associated with high-density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.42, p.1706-1713, 2001.

PONCE-SOTO, L.A.; TOYAMA, M.H.; HYSLOP, S.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **Journal of Protein Chemistry**, v.21, p.131-136, 2002.

PUNGERCAR, J., KRIZAJ, I. LIANG, N.S.; GUBENSEK, F. An aromatic, but not a basic, residue is involved in the toxicity of group-II phospholipase A₂ neurotoxins. **Biochemistry. J.** v. 341, p.139–45, 1999.

RODRIGUES, R.S.; IZIDORO, L.F.M.; TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SELISTRE-DE-ARAÚJUO, H.S.; GIGLIO, J.R.; FULY, A.L.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Isolation and functional characterization of a new phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v.50, p.153-165, 2007.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; DE OLIVEIRA JR., ROBSON J.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, ANDREIMAR M.; RODRIGUES, V.M. Snake Venom Phospholipases A₂: A New Class of Antitumor Agents. **Protein and Peptide Letters**, v.16, p.894-898, 2009.

RODRIGUES, R.S. **Análise do perfil de expressão gênica da glândula de peçonha de *Bothrops pauloensis* (*Bothropoides pauloensis*)**. 2010. 134f. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, Minas Gerais.

RUCAVADO, A.; SÁNCHEZ, E.F.; FRANCESCHI, A.; MAGALHAES, A.; GUTIERREZ, J.M. Characterization of the local tissue damage induced by LHF- II, a metalloproteinase with

weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, v.37, p. 1297-1312, 1999.

SANTOS-FILHO, N.A.; SILVEIRA, L.B.; OLIVEIRA, C.Z.; BERNARDES, C.P.; MENALDO, D.L.; FULY, A.L.; ARANTES, E.C.; SAMPAIO, S.V.; MAMEDE, C.C.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A.M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolates from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v.52, p.908-917, 2008.

SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FERRETTI, M.; BISCOGLIO, M.J.; RIVERA E.; CRESCENTI, E.J.; RIVERA, E.; BISCOGLIO, M.J.; FERRETTI M.; ESCOLANO J.; CALVETE J.J. Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. **Journal of Proteomics**, v.71, p.46-60, 2008.

SCHAGGER, H.; von JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v.166, p.368-379, 1987.

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1761 p.1246-1259, 2006.
SCOTT, D.L.; WHITE, S.P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M.H.; SIGLER, P.B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. **Science**, v.250, p.1541-1546, 1990.

SCOPES, R.K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. **Analytical Biochemistry**, v.59, p.277-282, 1974.

SILVA, C.B. **Caracterização bioquímica, estrutural e funcional de uma L-aminoácido oxidase isolada de peçonha de *Lachesis muta* (Serpentes, Viperidae)**. 2011. 145f. Tese (doutorado em ciências). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

SILVA JR, N.J.; BUCARETCHI, F. Mecanismo de Ação do Veneno Elapídico e Aspectos Clínicos dos Acidentes. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J.L.C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2.ed. São Paulo: Savier, 2009. p. 100-107.

SILVEIRA, L.B. **Caracterização funcional e estrutural de uma nova fosfolipase A₂ ácida de *Bothrops moojeni***. 2011. 100f. Tese (doutorado em ciências).Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

SINGH G.; JASTI J.; SARAVANAN K.; SHARMA S.; KAUR P.; SRINIVASAN A.; SINGH T.P. Crystal structure of the complex formed between a group I phospholipase A₂ and a naturally occurring fatty acid at 2.7 Å resolution. **Protein Science**, v.14, p. 395–400, 2005.

SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; BORTOLETO, R.K.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; ARNI, R.K.; WARD, R.J.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J.R. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.387, p.188–96, 2001a.

SOARES, A.M.; MANCIN A.C.; CECCHINI, A. L.; ARANTES, E.C. FRANÇA, S.C.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A₂ subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, 2001b.

SOARES DE MOURA, R.; AGUIAR, A.S.; MELGAREJO, A.R.; CARVALHO, L.C.R.M. Pharmacological profile of mouse hind-paw edema induced by *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon**, v.36, p.771–780, 1998.

STÁBELI, R.G.; AMUI, S.F.; SANT'ANA, C.D.; PIRES, M.G.; NOMIZIO, A.; MONTEIRO, M.C.; ROMÃO, P.R.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.; SOARES, A.M. *Bothrops moojeni* myotoxin-I, a Lys-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 142, p. 371-381, 2006.

STILES, B. G.; SEXTON, F.W.; WEINSTEIN, S.A. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**, v.29, p. 1129-1141, 1991.

TAKASAKI, J.; KAWAUCHI, Y.; URASAKI, T.; TANAKA, H.; USUDA, S.; MASUHO, Y. Antibodies against type II phospholipase A₂ prevent renal injury due to ischemia and reperfusion in rats. **FEBS Letters**, v.440, p.377-381, 1998.

TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; DA SILVA, F.M.N.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; SILVA JR, F.P.; IZIDORO, L.F.M.; FULY, A.L.; JULIANO, M.A.; DOS SANTOS, C.R.; MURAKAMI, M.T.; SAMPAIO, S.V.; DA SILVA, S.L.; SOARES, A.M. Molecular characterization of an acid phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. **Archives of Toxicology**, v.85, p.1219-1233, 2011.

VARANDA, E.A.; GIANNINI, M.J.S.M. Bioquímica de Venenos de Serpentes. In: BARRAVIERA, B. **Venenos: Aspectos Clínicos e Terapêuticos dos Acidentes por Animais Peçonhentos**. Rio de Janeiro: EPUB, 1999. p. 205-223.

VERHEIJ, H.M.; VOLWERK, J.J.; JASEN, E.H.; PUYK, W.C.; DIJKSTRA, B.W.; DRENTH, J.; DE HAAS, G.H. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry**, v.19, p.743-750, 1980.

VISHWANATH, B.S.; KINI, R.M.; GOWDA, T.V. Characterization of three edema-inducing phospholipase A₂ enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid*. **Toxicon**, v.25, p.501-515, 1987.

VISHWANATH, B.S.; KINI, R.M.; GOWDA, T.V. Purification and partial biochemical characterization of an edema inducing phospholipase A₂ from *Vipera russelli* (russel's viper) snake venom. **Toxicon**, v.26, p.713-720, 1988.

XU, S; GU, L.; WANG, Q.; SHU, Y.; SONG, S.; LIN, Z. Structure of a king cobra phospholipase A₂ determined from a hemihedrally twinned crystal. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v.59, p.1574–1581, 2003.

WAINAINA M.N.; SHIBATA T.; SMANMOO C.; KABASHIMA T.; KAI M. Fluorescence detection of amino acids in the postcleavage conversions for manual sequencing of a peptide. **Analytical Biochemistry**, v.374, p.423-425, 2008.

WATKINS, J.B. PROPERTIES AND TOXICITIES OF ANIMAL VENOMS. In: KLAASSEN, C.D. **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 7.ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 2008. p.1083-1102.

WEISS, J.; INADA, M.; ELSBACH, P.; CROWL, R.M. Structural determinants of the action against *Escherichia coli* of a human inflammatory fluid phospholipase A₂ in concert with polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.26331–2637, 1994.

YEDGAR, S.; LICHTENBERG, D.; SCHNITZER, E. Inhibition of phospholipase A₂ as a theurapeutic target. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1488, p. 182-187, 2000.

ZAMUDIO, K.R.; GREENE, H.W. Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.62, p 421-442, 1997.

ZULIANI, P.J.; FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; GUTIERREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v.45, p. 335-346, 2005.

ANEXO

ANEXO A- Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa - USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.112.53.8), intitulado "Purificação e Caracterização Bioquímica e Enzimática de Fosfolipase A₂ Ácida Presente na Peçonha de *Lachesis muta*", de autoria de **Tibério Gracco Kazuhiro Perini** e de **Eliane Candiani Arantes Braga**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do **Campus de Ribeirão Preto – USP** foi aprovado em reunião da CEUA de 06.06.2012.

Colaboradora: Francielle Almeida Cordeiro

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.112.53.8), entitled: "Purificação e Caracterização Bioquímica e Enzimática de Fosfolipase A₂ Ácida Presente na Peçonha de *Lachesis muta*", by **Tibério Gracco Kazuhiro Perini** and **Eliane Candiani Arantes Braga**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the **Campus of Ribeirão Preto – USP**, and was approved in the meeting, June, 6 2012.

Ribeirão Preto, 15 de junho de 2012.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

APÊNDICE

APÊNDICE A. Padronização do ensaio colorimétrico de atividade fosfolipásica.

Foi realizada a padronização de um método colorimétrico para a determinação da atividade fosfolipásica de acordo com Petrovic et al. (2001), para posteriormente determinar-se o K_m e o V_{max} da PLA₂ isolada. O método realizado em microplacas consiste na determinação da absorbância em 425 nm, após diferentes tempos de hidrólise a 37 °C, da mistura contendo substrato cromogênico NOB (4-Nitro-3-(*octanoyloxy*)benzoic acid) 1 mg/mL em tampão KCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e peçonha bruta 1 mg/mL dissolvida no mesmo tampão do substrato.

O volume de reação foi adaptado para 260 µL e os ensaios foram realizados em triplicata. A cada poço foram adicionados 80 µL da solução de peçonha e volume de substrato de 2,5; 5; 10; 15; 20 e 25 µL. Os volumes finais foram completados com tampão.

A placa foi incubada em banho de 37 °C e as leituras foram feitas de a cada 5 minutos no leitor de microplacas SUNRISE® (Tecan).

A Figura 18 mostra a relação do volume de substrato (1 mg/mL) pela absorbância obtida após 120 minutos de hidrólise na presença da peçonha (1 mg/mL, 80 µL). Este ensaio foi realizado com o intuito de padronizar a quantidade de substrato a ser utilizado nos ensaios de atividade fosfolipásica. Foram realizadas 53 leituras de absorbância e com os dados obtidos foram traçados os dois gráficos apresentados nas Figuras I e II.

Figura 18. Padronização do ensaio de atividade fosfolipásica por método colorimétrico. Relação entre absorvância em 425 nm e a quantidade de substrato hidrolisado pela peçonha após 120 min. Diferentes volumes (2,5, 5, 10, 15, 20 e 25 µL) de substrato (1 mg/mL) foram incubados por 120 min na presença de 80 µL da peçonha (1 mg/mL). O volume final de todos os poços foi completado com tampão até 260 µL e os ensaios foram realizados em triplicata.

O ensaio de atividade enzimática (Figura I) demonstrou que houve um aumento do valor da absorvância à medida que se aumentou a concentração do substrato. Isso indica que a peçonha bruta de *Lachesis muta* possui atividade fosfolipásica significativa na quantidade utilizada (80 µg) no ensaio. Para valores acima de 15 µL de substrato, a enzima trabalhou com velocidade máxima, uma vez que as concentrações do substrato foram saturantes, como demonstrado pelos valores praticamente iguais das absorvâncias obtidas para os volumes de 15, 20 e 25 µL de substrato.

A Figura II apresenta a relação entre a concentração do substrato *versus* absorvância em 425 nm após 60 minutos de incubação. Neste intervalo de tempo, todo o substrato adicionado à mistura reacional, nas diferentes concentrações, foi completamente hidrolisado pela peçonha, indicado por valores constantes na absorvância em diferentes tempos. Desta maneira, obteve-se uma relação linear entre a quantidade do substrato hidrolisado e a respectiva absorvância. Foi possível determinar a equação da reta $y = 0,0243x$, onde x é a absorvância em 425 nm (valor de absorvância constante) e y , a massa do substrato. De acordo com a equação da reta, quando temos uma absorvância igual a 1, o fator de correção equivale a 0,0243 mg/h/260 µL ou 0,0785 µmol/h/260 µL (uma vez que a massa molar do NOB

equivale a 309,3 g/mol). O fator de correção obtido nesta padronização está de acordo com o fator citado por Petrovic et al. (2001).

Este ensaio foi realizado com o intuito de obter a relação entre a absorbância e a quantidade de substrato hidrolisado. Esta relação foi utilizada em estudos para quantificar o substrato hidrolisado pela PLA₂ purificada para sua determinação de K_m e V_{max} .

Figura 19. Relação entre a quantidade de substrato hidrolisado e a respectiva absorbância em 425 nm. Os valores de absorbância utilizados foram obtidos após 60 minutos de incubação, quando já não se observavam alterações com o tempo, indicando que 100 % do substrato havia sido hidrolisado. Diferentes volumes (2,5, 5, 10, 15, 20 e 25 μL) de substrato (1 mg/mL) foram incubados por 60 minutos na presença de 80 μL da peçonha (1 mg/mL). O volume final de todos os poços foi de 260 μL e os ensaios foram realizados em triplicata. A diferença entre os volumes de substrato foi completada com tampão.