UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Isolamento e caracterização funcional de uma fosfolipase A₂ de
Bothrops jararaca: Avaliação do potencial antitumoral e
inflamatório**

Rafhaella Carolina Cedro Araújo

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Isolamento e caracterização funcional de uma fosfolipase A₂ de
Bothrops jararaca: Avaliação do potencial antitumoral e
inflamatório**

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

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Rafhaella Carolina Cedro Araújo

Orientadora: Profa. Dra. Suely Vilela

Ribeirão Preto

2014

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.

Cedro, Rafaella Carolina Araújo

Isolamento e caracterização funcional de uma fosfolipase A_2 de *Bothrops jararaca*: Avaliação do potencial antitumoral e inflamatório, 2014.

113 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Vilela, Suely.

1. BJ-PLA₂-I. 2. Fosfolipase A_2 3. *Bothrops jararaca*
4. Isolamento 5. Inflamação. 6. Asp-49. 7. Antitumoral.

Imagem da capa:

Foto da serpente *Bothrops jararaca* por © Fernando Bergamashi

Projeto Cobras Brasileiras – www.cobrasbrasil.com.br (acesso 01/11/2014)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: **Rafhaella Carolina Cedro Araújo.**

Título do trabalho: **Isolamento e caracterização funcional de uma fosfolipase A₂ de *Bothrops jararaca*: Avaliação do potencial antitumoral e inflamatório.**

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: **Profa. Dra. Suely Vilela**

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por estar em tudo e por nunca me faltar. Ao meu pai João por sempre me acompanhar com carinho e compreensão, por ser meu exemplo e minha fortaleza. À minha mãe Romilda pelo cuidado incondicional e por acreditar nos meus projetos. Sem vocês eu não conseguiria cumprir mais essa etapa da minha vida.

Aos professores de Alfenas, Maria Eliza Pereira Bastos de Siqueira e Álvaro José dos Santos Neto, por me apresentar à pesquisa, pelo incentivo que me deram para crescer na área acadêmica e pela paixão compartilhada pela Toxicologia.

À professora Suely Vilela, pela oportunidade de desenvolver o mestrado em Toxicologia em seu laboratório e pelo apoio e contribuição em todo o mestrado para que eu pudesse finalizar mais essa etapa.

Aos amigos queridos Tássia, Norival, Danilo, Tati e Luiz pela boa companhia, pelos ensinamentos e por toda a ajuda dedicada ao meu mestrado. Sei que com carinho, cada um de vocês contribuiu para eu chegar até aqui.

Aos amigos que encontrei no laboratório Marina, Tiago, Sante, Franco, Carol, Ana Laura, Regina, Marco. Obrigada pelas boas prosas e convivência diária.

Aos muitos amigos de Alfenas que reencontrei aqui, obrigada pelo suporte e por tornarem meus dias em Ribeirão mais aconchegantes.

À Dra. Karina Zoccal, por dedicar parte do seu tempo para me auxiliar nos experimentos de inflamação. Aprendi muito com você.

Aos professores que cederam seus alunos e funcionários, tempo e espaço para que eu pudesse chegar à conclusão deste trabalho.

À Universidade de São Paulo, agradeço pelo suporte dado para que eu pudesse desenvolver o mestrado. Por oferecer uma ótima estrutura aos estudantes.

Ao Instituto Butantan por gentilmente doar a peçonha de *Bothrops jararaca* utilizada no meu trabalho.

A CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro indispensável para a valorização profissional na área acadêmica e por permitir que a pesquisa caminhe no Brasil.

O RIO E O OCEANO

*“Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano ele treme
de medo.
Olha para trás, para toda a jornada, os cumes, as montanhas,
o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos
povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar
nele nada mais é do que desaparecer para sempre.
Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar.
Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência.
Você pode apenas ir em frente.
O rio precisa se arriscar e entrar no oceano.
E somente quando ele entra no oceano é que o medo
desaparece.
Porque apenas então o rio saberá que não se trata de
desaparecer no oceano, mas tornar-se oceano.
Por um lado é desaparecimento e por outro lado é
renascimento.
Assim somos nós.
Só podemos ir em frente e arriscar.
Coragem !
Avance firme e torne-se Oceano!”*

Osho

Resumo

CEDRO, R.C.A. Isolamento e caracterização funcional de uma fosfolipase A₂ de *Bothrops jararaca*: Avaliação do potencial antitumoral e inflamatório. 2014. 113 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) catalisam a hidrólise de ácidos graxos na posição *sn*-2 das membranas fosfolipídicas e liberam, como subprodutos, ácidos graxos livres. As PLA₂s do grupo IIA são encontradas em peçonhas de serpentes da família Viperidae e desempenham diversas atividades apresentando potencial miotóxico, neurotóxico, hemolítico, edematogênico, citotóxico, hipotensivo, anticoagulante, inibição/ativação da agregação plaquetária, bactericida e pró-inflamatório. Esse trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização funcional de uma PLA₂ isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*. Para a purificação dessa proteína, denominada BJ-PLA₂-I, foram necessários três passos cromatográficos consecutivos: cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200, cromatografia de troca iônica em SourceTM 15Q/50mL e cromatografia de troca iônica em MonoQTM 5/50 GL. A BJ-PLA₂-I apresentou elevado grau de pureza por SDS-PAGE e por cromatografia de fase reversa C18, em HPLC. Apresentou ainda, características ácidas, com pI em torno de 4,4 e teve a sua massa molecular determinada por dois métodos, obtendo-se valores bem próximos de 14,8 kDa (SDS-PAGE) e 14,2 kDa (MALDI-TOF). Esse fato é comum considerando que a espectrometria de massas é um método mais preciso e determina de maneira mais exata a massa molecular. O sequenciamento N-terminal da BJ-PLA₂-I resultou em 60 resíduos de aminoácidos. O alinhamento múltiplo com outras fosfolipases A₂ de serpentes do mesmo gênero mostrou similaridade entre elas, mostrando identidade de 100% com a BJ-PLA₂, fosfolipase A₂ Asp-49, também isolada da *Bothrops jararaca*. Esse dado levanta a hipótese de que a BJ-PLA₂-I purificada neste trabalho e a BJ-PLA₂ se tratam da mesma proteína, entretanto essa hipótese só poderá ser confirmada quando a sequência completa da BJ-PLA₂-I for obtida. Outros dados encontrados neste trabalho reforçam essa hipótese, isso porque, avaliando a atividade fosfolipásica, o efeito sobre as plaquetas e o pI, tanto a BJ-PLA₂-I quanto a BJ-PLA₂ apresentaram características semelhantes. A BJ-PLA₂-I, sendo uma Asp-49, mostrou alta atividade catalítica e efeito inibidor da agregação plaquetária induzida por ADP (20,5 µg/mL inibiu 50 % da agregação plaquetária). Ela também foi capaz de induzir a migração leucocitária após a administração de diferentes concentrações (5, 10 e 20 µg/mL) da BJ-PLA₂-I. Esse dado também foi encontrado no ensaio em que a concentração de 10 µg/mL foi fixada e variou-se o tempo de 2, 4 e 24 horas, observando-se principalmente a migração de neutrófilos. Além disso, verificou-se a liberação das citocinas IL-6 e IL-1β, de proteínas totais e de prostaglandina E₂ na reação inflamatória induzida pela BJ-PLA₂-I. No entanto, não foi observado a produção de TNF-α, IL-10 e leucotrieno B₄. A BJ-PLA₂-I caracterizou-se como uma PLA₂ pró-inflamatória, produzindo inflamação local aguda. A BJ-PLA₂-I foi avaliada quanto ao seu potencial antitumoral em três linhagens celulares distintas (PBMC, HL-60 e HepG2). Observou-se que a enzima em questão possui baixo potencial antitumoral para a linhagem HL-60, reduzindo o número de células tumorais em apenas cerca de 20% nas concentrações testadas. Verificou-se pequena alteração na viabilidade celular das células de PMBC, nas maiores concentrações testadas (160 e 80 µg/mL) e, na linhagem HepG2 não foi encontrada nenhuma alteração. Concluindo, as informações adquiridas neste trabalho são de suma importância para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas atividades biológicas desempenhadas pelas PLA₂s. Além disso, a BJ-PLA₂-I pode servir como modelo molecular para a formulação de fármacos mais eficazes a serem utilizados no tratamento de várias doenças.

Palavras-chave: BJ-PLA₂-I, fosfolipase A₂ ácida, *Bothrops jararaca*, isolamento, inflamação, Asp-49, agregação plaquetária, antitumoral.

Abstract

CEDRO, R.C.A. Isolation and functional characterization of a phospholipase A₂ from *Bothrops jararaca* snake venom: Evaluation of its antitumor and inflammatory potential. 2014. 113 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Phospholipases A₂ (PLA₂s) catalyze the hydrolysis of fatty acids in the sn-2 position of membrane phospholipids, releasing free fatty acids as by-products. PLA₂s of group IIA are found in snake venoms of the Viperidae family and perform various activities, including myotoxic, neurotoxic, hemolytic, edematogenic, cytotoxic, hypotensive, anticoagulant, inhibition/activation of platelet aggregation, bactericidal and proinflammatory effects. This work aimed at the isolation and functional characterization of a PLA₂ isolated from *Bothrops jararaca* venom. For the purification of this protein, called BJ-PLA₂-I, three consecutive chromatographic steps were used (size exclusion chromatography on Sephacryl S-200, ion exchange chromatography on Source 15Q/50 mL, ion exchange chromatography on MonoQ 5/50 GL). Confirmation of the purity of BJ-PLA₂-I was evaluated by SDS-PAGE and reverse phase HPLC using a C18 column. BJ-PLA₂-I has acidic characteristics, with pI around 4.4, and its molecular mass was determined by two methods, obtaining values close to 14.8 kDa (SDS-PAGE) and 14.2 kDa (MALDI-TOF). The N-terminal sequencing of BJ-PLA₂-I resulted in 60 amino acid residues. Multiple alignment with other phospholipases A₂ of snakes of the same genus showed high similarity between them, showing 100% identity with BJ-PLA₂, an Asp-49 phospholipase A₂ previously isolated from *Bothrops jararaca* venom. This finding raises the possibility that the PLA₂ purified in this work is the same protein previously described (BJ-PLA₂), however, this assumption can only be confirmed when the complete sequence of BJ-PLA₂-I is obtained. Other data obtained in this study support this hypothesis, considering that the phospholipase activity, the effect on platelets and pI of both BJ-PLA₂-I and BJ-PLA₂ showed to be similar. BJ-PLA₂-I, being an Asp-49 PLA₂, showed high catalytic activity and inhibitory effect on the platelet aggregation induced by ADP (20.5 µg/mL inhibited 50% of the platelet aggregation). It was also able to induce leukocyte migration after the administration of different concentrations (5, 10 and 20 µg/mL) of BJ-PLA₂-I. This fact was also found when the concentration of 10 µg/mL was fixed and response times were varied (2, 4 and 24 hours), observing especially neutrophil migration. Furthermore, there was a release of IL-6 and IL-1β, total proteins and prostaglandin E₂ in the inflammatory reaction induced by BJ-PLA₂-I, however, the production of TNF-α, IL-10 and leukotriene B₄ was not observed. BJ-PLA₂-I was characterized as a proinflammatory PLA₂ producing acute local inflammation. BJ-PLA₂-I was evaluated for its antitumor potential on three different cell lines (PBMC, HL-60 and HepG2). It was observed that this enzyme showed a low antitumor potential on HL-60 tumor cell line, reducing the number of tumor cells in only about 20% at the concentrations tested. There was little change in cell viability of PBMC cells in the higher concentrations tested (80 and 160 µg/mL), but no change was found on HepG2 tumor cell line. In conclusion, the information obtained in this work are of utmost importance for better understanding the mechanisms involved in the biological activities induced by PLA₂s. Furthermore, BJ-PLA₂-I may serve as a molecular model for the formulation of more effective drugs to be used in the treatment of various diseases.

Keywords: BJ-PLA₂-I, acidic phospholipase A₂, *Bothrops jararaca*, isolation, inflammation, Asp-49, platelet aggregation, antitumor.

Lista de figuras

Figura 1. Serpente da espécie <i>Bothrops jararaca</i>	4
Figura 2. Sítio de ação das fosfolipases.	8
Figura 3. Distribuição das proteínas em porcentagem (%) encontradas na peçonha da serpente <i>Bothrops jararaca</i> obtida a partir da técnica proteômica.....	13
Figura 4. Purificação da BJ-PLA ₂ -I a partir da peçonha de <i>Bothrops jararaca</i>	43
Figura 5. Determinação da massa molecular da BJ-PLA ₂ -I.	45
Figura 6. Determinação da massa molecular da BJ-PLA ₂ -I por MALDI-TOF-TOF MS.....	46
Figura 7. Focalização isoeletrica da BJ-PLA ₂ -I.....	47
Figura 8. Alinhamento múltiplo da sequência parcial de aminoácidos da BJ-PLA ₂ -I com sequências de outras fosfolipases A ₂ de peçonhas de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	47
Figura 9. Atividade fosfolipásica.....	48
Figura 10. Efeito sobre as plaquetas.	49
Figura 11. Contagem total e diferencial de leucócitos presentes na cavidade peritoneal de camundongos após a administração de diferentes concentrações da BJ-PLA ₂ -I.	51
Figura 12. Contagem total e diferencial de leucócitos presentes na cavidade peritoneal de camundongos após a administração da BJ-PLA ₂ -I em diferentes tempos.....	52
Figura 13. Dosagem das citocina IL-6 e IL-1 β	53
Figura 14. Dosagem de proteínas totais.	54
Figura 15. Dosagem do mediador lipídico PGE ₂	54
Figura 16. Teste de Viabilidade celular das linhagens celulares PBMC (A), HL-60 (B) e HepG2 (C) tratadas com BJ-PLA ₂ -I.	57

Lista de tabelas

Tabela 1. Componentes isolados da peçonha da serpente <i>Bothrops jararaca</i>	6
Tabela 2. Classificação das fosfolipases*	10
Tabela 3. Recuperação proteica do processo de purificação da BJ-PLA ₂ -I.....	44

Lista de abreviaturas e siglas

AA	Ácido araquidônico
ACN	Acetonitrila
AMBIC	Bicarbonato de Amônio
BPB	Brometo de p-bromofenacila
BSA	Soroalbumina bovina
COX	Ciclooxigenase
DEMEN	Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Gibco-BRL
DMSO	Dimetil sulfóxido
ESI	Ionização por eletrospray
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC₅₀	Concentração capaz de inibir 50% da atividade promovida
IL	Interleucina
LAO	L-aminoácido oxidase
LOX	Lipooxigenase
LT	Leucotrieno
MALDI-TOF	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo
Mr	Massa molecular relativa
MS	Espectrometria de massas
MTT	Brometo 3 - [4,5-dimetil-tiazol - 2-il] - 2,5 - difenil-tetrazólio
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis
PBS	Salina tamponada com fosfato
PG	Prostaglandina
pI	Ponto isoelétrico
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
RPMI	Meio de cultura do "Roswell Park Memorial Institute", Gibco-BRL
SD	Desvio padrão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TNF-α	Fator de necrose tumoral α

Sumário

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
1- Introdução.....	1
1.1 - Acidentes Ofídicos	1
1.2 - Gênero <i>Bothrops</i>	2
1.3 - <i>Bothrops jararaca</i>	4
1.4 - Fosfolipases	7
1.4.1 - Fosfolipases A ₂ isoladas de peçonhas de serpentes (svPLA ₂ s).....	11
1.5 - svPLA ₂ s e o Processo Inflamatório	15
1.6 - Potencial antitumoral das svPLA ₂ s.....	19
2 - Objetivos.....	24
2.1 - Objetivo geral	24
2.2 - Objetivos específicos	24
3 - Materiais e Métodos	26
3.1 - Materiais.....	26
3.1.1 - Peçonha e outros materiais.....	26
3.1.2 - Animais.....	26
3.1.3 - Plasma	26
3.1.4 - Linhagens celulares	26
3.2 - Métodos	27
3.2.1 - Isolamento da fosfolipase A ₂ da peçonha de <i>Bothrops jararaca</i>	27
3.2.1.1 - Cromatografia de Exclusão Molecular em Sephacryl S-200	27
3.2.1.2 - Cromatografia de Troca Iônica em Source™ 15 Q.....	28
3.2.1.3 - Cromatografia de Troca Iônica em Mono Q™ 5/50 GL	28
3.2.1.4 - Cromatografia em fase reversa em coluna CLC-ODS C18.....	29
3.2.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	30
3.2.3 - Determinação da Concentração Proteica.....	30
3.2.4 - Caracterização Bioquímica.....	30
3.2.4.1 - Determinação da Massa Molecular	31
3.2.4.1.1 - Determinação da Massa Molecular por SDS-PAGE.....	31
3.2.4.1.2 - Determinação da Massa Molecular por MALDI-TOF MS	31
3.2.4.2 - Focalização Isoelétrica	31
3.2.5 - Caracterização Estrutural	32

3.2.5.1 - Sequenciamento N-Terminal.....	32
3.2.5.2 - Sequenciamento de peptídeos tripticos	33
3.2.5.3 - Alinhamento Múltiplo das Sequências Parciais Obtidas.....	34
3.2.6 - Caracterização Funcional.....	34
3.2.6.1 - Determinação da Atividade Fosfolipásica.....	35
3.2.6.2 - Efeito sobre plaquetas.....	35
3.2.6.3 - Análise do Exsudato Inflamatório Peritoneal	36
3.2.6.4 - Dosagem indireta de óxido nítrico (NO) pela reação de Griess	37
3.2.6.5 - Quantificação de Citocinas por ELISA.....	37
3.2.6.6 - Determinação da Concentração de Mediadores Lipídicos	37
3.2.6.7 - Avaliação do Potencial Antitumoral	38
3.2.6.7.1 - Manutenção da linhagem celular em suspensão (HL-60)	38
3.2.6.7.1.1 - Subcultivo da HL-60	38
3.2.6.7.2 - Manutenção da linhagem celular aderente (HepG2)	39
3.2.6.7.2.1 - Subcultivo da HepG2.....	39
3.2.6.7.3 - Viabilidade celular	39
3.2.6.8 - Análise Estatística	40
4 - Resultados.....	42
4.1 - Isolamento da Fosfolipase A ₂ da peçonha da serpente <i>Bothrops jararaca</i>	42
4.1.1 - Recuperação do processo de purificação da BJ-PLA ₂ -I.....	44
4.2 - Determinação da Massa Molecular	44
4.2.1 - Por SDS-PAGE	44
4.2.2 - Por Espectrometria de massas MALDI-TOF-TOF MS	45
4.3 - Determinação do ponto isoelétrico (pI).....	46
4.4 - Sequenciamento Parcial da BJ-PLA ₂ -I.....	47
4.5 - Atividade Fosfolipásica.....	48
4.6 – Efeito sobre as plaquetas	48
4.7 - Ação da BJ-PLA ₂ -I sobre o processo inflamatório.....	49
4.7.1 - Contagem total e diferencial de leucócitos presentes nos exsudatos inflamatórios de camundongos, após 4 horas de administração da BJ-PLA ₂ -I em diferentes concentrações.....	49
4.7.2 - Contagem total e diferencial de leucócitos presentes nos exsudatos inflamatórios de camundongos, após diferentes tempos de administração da BJ-PLA ₂ -I na concentração de 10 µg/mL	51
4.7.3 - Determinação de citocinas, óxido nítrico e mediadores lipídicos no lavado peritoneal após administração de BJ-PLA ₂ -I.....	52
4.8 - Avaliação da citotoxicidade nas linhagens celulares HL-60, HepG2 e PBMC	55
5 - Discussão	59
6 - Conclusões.....	76
7 - Referências.....	79

INTRODUÇÃO

1- Introdução

1.1 - Acidentes Ofídicos

As serpentes peçonhentas estão distribuídas mundialmente, entretanto os acidentes causados por elas são mais evidenciados nas regiões tropicais, principalmente, nos países situados na Ásia, África, Oceania e na América Latina (KASTURIRATNE et al., 2008).

Os dados epidemiológicos gerados a partir dos acidentes ofídicos são estimados, por meio de registros hospitalares e referências epidemiológicas. Esses dados são, em sua maioria, subestimados, uma vez que em grande parte dos países a compilação dos mesmos é incompleta ou muitas vezes não acontece (KASTURIRATNE et al., 2008).

Em um recente estudo feito pela Organização Mundial da Saúde (OMS), por ano ocorre mais de 1 milhão de envenenamentos por serpentes e mais de 90.000 mortes, em todo o mundo. Além disso, em 2009, a OMS incluiu os acidentes ofídicos na lista das Doenças Tropicais Negligenciadas, mas estratégias políticas para evitá-los não foram propostas (WHO, 2014) (www.who.int/neglected_diseases).

Uma característica importante dos acidentes envolvendo serpentes é que eles acometem principalmente regiões pobres, onde as políticas públicas não atuam. Geralmente, são países subdesenvolvidos, que possuem regiões de conflitos, onde as questões de segurança e saúde são precárias. As evidências mostram que é nas economias mais pobres do mundo que o ônus dos acidentes ofídicos é maior, sendo que a sobrevivência não é garantia de uma recuperação completa, considerando que as sequelas deixadas por eles deixam as vítimas permanentemente incapacitadas e psicologicamente abaladas (KASTURIRATNE et al., 2008).

Na América Latina, os acidentes ofídicos são considerados como um problema de saúde pública, afetando mais de 80.000 pessoas. As espécies de serpentes responsáveis pelo maior número de envenenamentos no norte da América são as cascavéis e algumas jararacas (*Crotalus* ssp e *Bothrops* ssp, respectivamente). Já no sul da América, os acidentes causados pelas jararacas são mais evidenciados do que os envolvendo as cascavéis (www.snakebiteinitiative.org).

Apesar de o ofidismo ser um problema sério para muitos países da América, no Brasil, só em 1986 os acidentes ofídicos passaram a ser de notificação

obrigatória. Isso devido a uma crise de produção de soro no país, que levou à morte de uma criança em Brasília, o que deu início a uma nova etapa no controle de acidentes com animais peçonhentos. A distribuição do soro, nessa época, estava intimamente ligada ao número de casos notificados em cada região, alternativa adotada pelo Ministério da Saúde para fornecer o soro adequadamente. Entretanto, com a produção do soro estabilizada e atendendo à demanda satisfatoriamente, muitos municípios e estados deixaram de notificar os acidentes, e como resultado têm-se esses dados subestimados (BOCHNER e STRUCHINER, 2002).

No Brasil, estima-se que mais de 20.000 pessoas são vítimas de envenenamento por serpentes. Entre os anos 2000 a 2013, foram relatados mais de 2.000 óbitos pelo SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), sendo que na região sudeste os números são mais expressivos, observando-se uma incidência de 62% no número de óbitos (www.saude.gov.br/sinanweb/).

Existem quatro gêneros de serpentes peçonhentas no Brasil, sendo elas: *Bothrops*, *Crotalus*, *Laquesis* e *Micrurus*. Essas serpentes encontram-se distribuídas por todo o território nacional e são comumente encontradas nas zonas rurais e periferias de grandes cidades, onde as condições sanitárias são insuficientes (FUNASA, 2001).

1.2 - Gênero *Bothrops*

Há 10 anos, a classificação taxonômica das serpentes do gênero *Bothrops* vem sendo questionada, devido à ampla distribuição das mesmas em todo o território mundial e pelo desenvolvimento da tecnologia, que vem possibilitando a descoberta de novas características. A nova organização sugere que, a classificação seja feita de acordo com a localização geográfica e as novas informações taxonômicas, advindas de dados obtidos pelo advento da tecnologia. Ela sugere que, com as modificações decorrentes das novas informações, possam ser incluídas novas espécies e a reclassificação das já conhecidas. Na nova classificação, o gênero *Bothrops* se divide em cinco: *Bothriopsis*, *Bothropoides*, *Bothrops* e *Rhinocerophis*. Entretanto, estudos mostram que os gêneros *Bothrops* e *Bothriopsis* são sinônimos e a maioria dos estudos envolvendo as serpentes deste gênero ainda utilizam a classificação *Bothrops* (CARRASCO, 2012).

No Brasil, dentre as 256 espécies de serpentes catalogadas, 69 são consideradas peçonhentas e desse total, um pouco mais de 30 espécies pertencem ao gênero *Bothrops*. As serpentes desse gênero pertencem à família Viperidae e as espécies mais conhecidas são as seguintes: *Bothrops atrox* (*B. atrox*), que é encontrada mais ao norte do país, a *Bothrops alternatus* (*B. alternatus*) que habita principalmente o sul do país, a *Bothrops jararacussu* (*B. jararacussu*) que está distribuída na região sudeste em florestas tropicais e no cerrado, a *Bothrops moojeni* (*B. moojeni*) encontrada nas regiões sul e sudeste, a *Bothrops neuwiedi* (*B. neuwiedi*) que está distribuída em todo o território nacional, com exceção do norte do país e a *Bothrops jararaca* (*B. jararaca*) que habita principalmente as regiões sul e sudeste (TOKARNIA e PEIXOTO, 2006). As serpentes desse gênero são conhecidas popularmente como jararaca, ouricana, urutu-cruzeira, caiçara e possuem hábitos predominantemente noturnos. Preferem ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e onde há proliferação de roedores como paióis e celeiros (FUNASA, 2001).

Os acidentes envolvendo serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 90% dos envenenamentos, sendo de grande importância epidemiológica no Brasil. Esses acidentes são caracterizados pela sensação de dor e formação de edema intenso, observam-se também bolhas acompanhadas ou não de necrose e instalação de processo inflamatório, como reações sistêmicas têm-se equimoses e sangramentos no local da picada (FUNASA, 2001).

A peçonha dessas serpentes tem 3 ações principais: proteolítica, coagulante e hemorrágica (BARRAVIERA, 1994).

A ação proteolítica se deve principalmente a presença de proteases, hialuronidases, fosfolipases, mediadores inflamatórios e hemorraginas da peçonha. Essa ação manifesta-se na forma de bolhas, edema e necrose observada nas vítimas. A peçonha de serpentes *Bothrops* é também capaz de ativar fatores de coagulação como o X e a protrombina, além disso, atua semelhantemente à trombina e converte fibrinogênio em fibrina. Essas ações afetam diretamente a coagulação sanguínea, pelo consumo de seus fatores além da geração de produtos de degradação de fibrina e fibrinogênio, o que leva a um quadro de incoagulabilidade sanguínea. Outra ação se dá na função plaquetária, causando alterações, como por exemplo, a plaquetopenia. Já a hemorragia é desencadeada pela ação proteolítica e coagulante juntamente com a atuação de hemorraginas

presentes na peçonha, capazes de provocarem lesões nos capilares e desenvolver quadro de inflamação na vítima (BARRAVIERA, 1994).

O envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* podem ter como complicações as manifestações clínicas como abscessos, choque, sangramento extenso, síndrome compartimental, necrose com amputação e ou sequela funcional, além de insuficiência renal aguda (TEIXEIRA, 2003).

1.3 - *Bothrops jararaca*

As serpentes da espécie *Bothrops jararaca* (Fig. 1) são as mais comumente encontradas no Brasil, principalmente ao sul e sudeste do país como citado anteriormente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Como características, essas serpentes podem atingir, em média, até 1,6 metros de comprimento, sendo que o corpo é coberto por escamas de cor marrom e manchas triangulares escuras com faixas horizontais pretas atrás dos olhos. O dorso é pálido e a língua é de coloração negra. Elas se alimentam basicamente de roedores e anuros e habitam principalmente regiões úmidas como encostas de córregos e na vegetação em pedras ou margens dos corpos d'água (CARRASCO et al., 2012).

Figura 1. Serpente da espécie *Bothrops jararaca*. Fonte: www.ambiente.sp.gov.br/parque-da-cantareira.

As manifestações decorrentes dos acidentes ofídicos, como por exemplo, edema e necrose, estão diretamente relacionadas aos componentes presentes na peçonha. No envenenamento por serpente *Bothrops jararaca* as manifestações clínicas mais observadas são a necrose e o edema, seguida do processo de inflamação (HARTMMAN et al., 2003; MARTINS et al., 2008)

A peçonha é produzida por um par de glândulas exócrinas especializadas, conectadas as presas por ductos (ÂNGULO E LOMONTE, 2008; BROW et al., 2009). Das peçonhas já foram isolados inúmeros compostos bioativos, dentre eles proteínas, peptídeos, íons, carboidratos. As proteínas chegam a representar 90% da massa seca da peçonha e elas têm sido caracterizadas quanto à sua composição bioquímica. Como exemplos de componentes enzimáticos têm-se as metaloproteases e serinoproteases, as L-aminoácido oxidases (LAAOs), as hialuronidases e as fosfolipases. Como componentes não enzimáticos estão as desintegrinas e as lectinas tipo-C (GUTIÉRREZ, 2002; MEBS et al., 2002).

Os principais componentes presentes nas peçonhas do gênero *Bothrops* são as metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases, desintegrinas e peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP) (SOUSA et al., 2013). Na Tabela 1, são apresentados alguns componentes isolados da peçonha de *Bothrops jararaca*.

Tabela 1. Componentes isolados da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*.

Componentes	Classe proteica	Referências
Jararhagina	Metaloprotease	Assakura, Reichl e Mandelbaum (1986)
Bothrojaractivase	Metaloprotease	Berger, Pinto e Guimarães (2008)
Bothropasina	Metaloprotease	Mandelbaum, Reichel e Assakura (1982)
BJ-PI	Metaloprotease	Da Silva et al.(2012)
Protease A	Serinoprotease	Mandelbaum e Henriques (1964)
Bothrombina	Serinoprotease	Nishida et al.(1994)
KN-BJ 1	Serinoprotease	Serrano et al. (1998)
KN-BJ 2	Serinoprotease	Serrano et al. (1998)
Jarastatina	Desintegrina	Coelho et al. (1999)
Bothrostatina	Desintegrina	Fernandez et al. (2005)
BJ-PLA ₂	Fosfolipase A ₂	Serrano et al.(1999)

As metaloproteases são hidrolases tipo endopeptidases que dependem da ligação a um metal, em geral o zinco, em seu sítio catalítico para desempenhar as atividades enzimáticas. Elas são responsáveis pela mionecrose no local da picada, hemorragias e reações inflamatórias. Mandelbaum e colaboradores (1982) purificaram a bothropasina, uma metaloprotease ácida, da peçonha de uma *Bothrops jararaca* (MANDELBAUM et al.,1982). As serinoproteases são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas por mecanismos de catálise e atuam afetando a cascata de coagulação. Mandelbaum e colaboradores (1964) relataram pela primeira vez o isolamento de uma serinoprotease, denominada de protease A da peçonha de *Bothrops jararaca* (MANDELBAUM e HENRIQUES, 1964). Outra serinoprotease isolada da mesma peçonha e parcialmente caracterizada. foi relatada por Nishida e colaboradores (1994), a bothrombina (NISHIDA et al., 1994). A presença de peptídeos potenciadores de bradicinina na peçonha da *Bothrops*

jararaca foi evidenciada pela primeira vez em 1949, pelos pesquisadores Rocha e Silva, Beraldo e Rosenfeld (HENRIQUES et al., 1960). Essa molécula serviu como modelo para a produção do medicamento mais usado atualmente para o tratamento da hipertensão, o captopril ® (FOX e SERRANO, 2007). As desintegrinas são peptídeos de baixa massa molecular, que se ligam às integrinas, proteínas de superfície celular responsáveis pela proliferação, diferenciação e ativação celular. Dentre as isoladas de peçonhas de serpentes, Fernandez e colaboradores (2005) obtiveram a bothrostatina a partir da *Bothrops jararaca* (FERNANDEZ et al., 2005). Outro componente encontrado na peçonha da *Bothrops jararaca* são as fosfolipases, enzimas que atuam na cadeia fosfolipídica. Uma PLA₂ foi isolada da peçonha desta espécie de serpente por Machado e colaboradores (1993), utilizando inicialmente uma cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S-200 seguida de uma cromatografia de fase reversa em coluna C18 (MACHADO et al., 1993). A BJ-PLA₂, também é uma fosfolipase A₂ ácida obtida da peçonha de *Bothrops jararaca* pela combinação de 3 passos cromatográficos (SERRANO et al., 1999).

Para o isolamento desses compostos, a partir da peçonha bruta das serpentes, as técnicas cromatográficas são as mais reportadas, dentre elas têm-se a cromatografia de exclusão molecular, de troca iônica, de afinidade e de fase reversa (CALVETE, 2009).

Como citado anteriormente, Serrano e colaboradores (1999) isolaram a BJ-PLA₂ da peçonha de *Bothrops jararaca* utilizando a precipitação proteica com sulfato de amônio e dois passos cromatográficos, sendo eles, a cromatografia de troca iônica em coluna DEAE Sephacel e uma cromatografia de fase reversa em coluna C3 (SERRANO et al., 1999).

1.4 - Fosfolipases

As fosfolipases são enzimas lipolíticas e, de acordo com o local onde ocorre a hidrólise (Fig. 3), elas são classificadas em 5 famílias, sendo elas: A₁ (PLA₁), A₂ (PLA₂), B (PLB), C (PLC) e D (PLD) (DENNIS, 1994).

Figura 2. Sítio de ação das fosfolipases. Adaptado de KINI, 1997. (Fonte: OLIVEIRA, 2006).

As fosfolipases A_1 (PLA_1) clivam a cadeia fosfolipídica na posição *sn*-1 e são encontradas nos mais diversos tecidos e organismos (AOKI et al., 2002). Nas indústrias farmacêuticas são utilizadas como insumo, devido à ação emulsificante que possuem (SONG; RHEE, 2001).

As fosfolipases A_2 catalisam a hidrólise de ácidos graxos na posição *sn*-2 das membranas fosfolipídicas e liberam, como subprodutos, ácidos graxos livres. Os principais ácidos graxos liberados são os poli-insaturados, dentre eles o ácido araquidônico e os lisofosfolipídeos. O ácido araquidônico é um precursor de eicosanoides (presentes na inflamação) e de lisofosfolipídios como o ácido lisofosfatídico e lisofosfatidilcolina. Os lisofosfolipídios são precursores de mediadores bioativos como o fator de ativação plaquetária (PAF) (KUDO, 2004).

As fosfolipases B são enzimas que clivam as ligações *sn*-1 e *sn*-2, simultaneamente, demonstrando assim atividade fosfolipídica e lisofosfolipídica, desacilando completamente os seus substratos. Também possui atividade fosfolipase-transacilase em fungos (CHEN et al., 2000), sendo considerada fator de virulência para alguns patógenos (SHEN et al., 2004).

As fosfolipases C (PLC) são fosfodiesterases que possuem vários domínios, capazes de produzir inositol 1,4,5-trifosfato ($InsP_3$, mensageiro mobilizador de cálcio) e diacilglicerol (DAG) ativador da quinase C, sendo de suma importância no metabolismo de fosfolipídios inositólicos (REBECCHI; PENTYALA, 2000). Também possuem ação importante na sinalização celular em mamíferos, agindo em hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento e outros estímulos extracelulares (HARDEN; SONDEK, 2006).

As fosfolipases D (PLD) hidrolisam glicerofosfolipídios produzindo aminoálcool e ácido fosfatídico, além de catalisarem reações de transfosfatidilação (ULBRICH-HOFMANN et al., 2005).

As fosfolipases A_2 ainda foram divididas em 6 grandes grupos, PLA_2 s secretadas (s PLA_2), PLA_2 s citosólicas (c PLA_2), PLA_2 s Ca^{2+} -independentes (i PLA_2), PLA_2 s fator de plaquetas ativador de acetilhidrolases (PAF-AH), PLA_2 s lisossomais (Ly PLA_2) e PLA_2 s de adipócitos específicos (Ad PLA_2) (QUACH et al., 2014).

Six e Dennis (2000), baseando-se em critérios bioquímicos e estruturais, como a massa molecular relativa (Mr), padrão de pontes dissulfeto, substrato fosfolipídico, sequência de aminoácidos, dependência de íon Ca^{2+} , estrutura gênica e atividade catalítica, dividiu os 6 grupos formando 15 subfamílias, como mostra a Tabela 2 (SIX e DENNIS, 2000).

A denominação de PLA_2 s secretadas foi dada devido a grande quantidade de PLA_2 s do grupo II encontradas em fluidos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide e se estendeu para as outras. As s PLA_2 s compreendem os grupos I, II, III, V, IX, X, XI e XII (SIX e DENNIS, 2000). Aquelas presentes no grupo I são encontradas no suco pancreático de mamíferos e na peçonha das serpentes das famílias Elapidae e Hydrophidae. Já as do grupo II são encontradas na peçonha das serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae, na peçonha da serpente Gaboon (grupo IIB), no testículo de camundongos (IIC), no baço e pâncreas de camundongos e humanos (grupo IID), no útero, cérebro e coração de camundongos e humanos (IIE) e no embrião e testículos de camundongos (grupo IIF) (SIX e DENNIS, 2000). No grupo III, estão representadas as s PLA_2 s de veneno de abelha, lagartos, exsudatos inflamatórios e grânulos de plaquetas e mastócitos. No grupo V encontram-se as PLA_2 s de macrófagos, coração e pulmão de mamíferos. O grupo X é composto pelas PLA_2 s isoladas do timo, baço e leucócitos de humanos. E, as s PLA_2 s dos grupos XI e XII foram isoladas de plantas e células T-helper, respectivamente (DENNIS, 1994; HO et al., 2001).

Tabela 2. Classificação das fosfolipases*

Grupo	PLA ₂	Fonte	Massa relativa (Mr)	Características
IA	sPLA ₂	Hydrophiidae e Elapidae	13–15	7 pontes dissulfeto
IB	sPLA ₂	Pâncreas suíno e humano	13–15	7 pontes dissulfeto
IIA	sPLA ₂	Crotalinae, fluido sinovial humano	13–15	7 pontes dissulfeto
IIB	sPLA ₂	Víbora de Gaboon	13–15	6 pontes dissulfeto
IIC	sPLA ₂	Testículo de rato e murino	15	8 pontes dissulfeto
IID	sPLA ₂	Baço/pâncreas humano e murino	14–15	7 pontes dissulfeto
IIE	sPLA ₂	Cérebro/coração/útero humano e murino	14–15	7 pontes dissulfeto
IIF	sPLA ₂	Testículo/embrião humano e murino	16–17	6 pontes dissulfeto
III	sPLA ₂	Humano/murino/lagarto/abelha	15–18; 55 (humano/murino)	8 pontes dissulfeto
IVA	cPLA ₂	Humano/murino	85	Domínio C2
IVB	cPLA ₂	Humano	114	Domínio C2
IVC	cPLA ₂	Humano	61	Acilado
IVD	cPLA ₂	Humano/murino	92–93	Domínio C2
IVE	cPLA ₂	Murino	100	Domínio C2
IVF	cPLA ₂	Murino	96	Domínio C2
V	sPLA ₂	Macrófago/pulmão/coração de humano e murino	14	6 pontes dissulfeto
VIA-1	iPLA ₂	Humano/murino	84–85	8 repetições de sequência consenso
VIA-2	iPLA ₂	Humano/murino	88–90	7 repetições de sequência consenso
VIB	iPLA ₂	Humano/murino	88–91	Ligada a membrana
VIC	iPLA ₂	Humano/murino	146	Proteína integral de membrana
VID	iPLA ₂	Humano	53	Triacilglicerol lipase
VIE	iPLA ₂	Humano	57	Triacilglicerol lipase
VIF	iPLA ₂	Humano	28	Triacilglicerol lipase
VIIA	PAF-AH	Humano, murino, suíno, bovino	45	Secretada, α/β hydrolase
VIIB	PAF-AH	Humano, bovino	40	Intracelular, PAF α/β hydrolase
VIIIA	PAF-AH	Humano	26	Intracelular, tríade Ser/His/Asp, homodímero ou heterodímero
VIIIB	PAF-AH	Humano	26	Intracelular, tríade Ser/His/Asp, homodímero ou heterodímero
IX	sPLA ₂	Caracol (conodipine-M)	14	6 pontes dissulfeto
X	sPLA ₂	Leucócito/timo/baço humanos	14	8 pontes dissulfeto
XIA	sPLA ₂	Broto verde de arroz (PLA2-I)	12.4	6 pontes dissulfeto
XIB	sPLA ₂	Broto verde de arroz (PLA2-II)	12.9	6 pontes dissulfeto
XII	sPLA ₂	Humano/murino	19	7 pontes dissulfeto
XIII	sPLA ₂	Parvovírus	<10	sem pontes dissulfeto
XIV	sPLA ₂	Fungo simbiótico/bactéria	13–19	2 pontes dissulfeto
XV	PLA ₂ lisossomal	Humano, murino, bovino	45 (deglicosilada)	Tríade Ser/His/Asp, glicosilada, sequência sinal N-terminal

*De acordo com Schaloske e Dennis (2006).

1.4.1 - Fosfolipases A₂ isoladas de peçonhas de serpentes (svPLA₂s)

Como dito anteriormente, as PLA₂s encontradas em peçonhas de serpentes, abreviadas em svPLA₂, podem ser classificadas em dois grupos, o I (serpentes das famílias Elapidae e Hydrophidae) ou II (família Viperidae e subfamília Crotalidae), sendo que as PLA₂s isoladas de serpentes do gênero *Bothrops*, estão incluídas no grupo II, especificamente, IIA. Em geral, as PLA₂s de serpentes possuem massa molecular de 13 a 15 kDa, cerca de 120 resíduos de aminoácidos e sua estrutura é estabilizada por 7 a 8 pontes dissulfeto. Elas podem exibir características ácidas ou básicas. Além disso, de acordo com o aminoácido na posição 49 podem ser divididas entre PLA₂s Asp-49 e PLA₂s Lys-49, sendo esta última também denominada de PLA₂s homólogas ou ainda PLA₂s-like. As svPLA₂s, em sua estrutura, possuem um sítio catalítico conservado que é formado por quatro resíduos de aminoácidos sendo eles: His-48, Asp-49, Tyr-52 e o Asp-99. Juntamente com os resíduos do loop de ligação ao íon cálcio (Ca²⁺), o ácido aspártico na posição 49 coordena a reação de hidrólise de fosfolipídios, sendo que a substituição do resíduo de ácido aspártico pela lisina traz, como consequência, perda total ou parcial na atividade catalítica, já que a ligação ao cálcio fica comprometida (WARD et al., 1998).

As PLA₂s Asp-49 apresentam alta atividade catalítica, uma vez que, a presença do ácido aspártico na posição 49 é crucial para a ligação ao cálcio e esse íon é um cofator essencial para a atividade catalítica. Entretanto, as PLA₂s que possuem a lisina na posição 49 manifestam uma baixa ou nenhuma atividade catalítica, apesar de apresentarem regiões homólogas às Asp-49. Uma característica importante das Lys-49, é que, mesmo não exibindo uma hidrólise significativa elas são extremamente ativas na indução da mionecrose, por um ou mais mecanismos ainda não muito conhecidos (OWNBY et al., 1999). As PLA₂s denominadas de BI-PLA₂ isolada da peçonha de *Bothrops leucurus* (NUNES et al., 2011), BE-I-PLA₂, obtida da peçonha de *Bothrops erythromelas* (DE ALBUQUERQUE MODESTO et al., 2006), BaspPLA₂-II, encontrada na peçonha de *Bothrops asper* (FERNÁNDEZ et al., 2010) e também a BaSplI RP4 isolada de *Bothrops alternatus* (DENEGRÍ et al., 2010) são exemplos de PLA₂s Asp-49 que apresentaram significativa atividade catalítica. Dentre as PLA₂s isoladas de serpentes e caracterizadas como Lys-49 têm-se BaPLA₂-I (FURTADO et al., 2014),

a bothropstoxina-I (WARD et al., 2002) e a BP-I (SHIMOHIGASHI et al., 1995) que foram obtidas das seguintes serpentes: *Bothrops atrox*, *Bothrops jararacussu* e *Trimeresurus flavoviridis*, respectivamente. Basicamente, as PLA₂s ácidas pertencem ao grupo das Asp-49 entretanto, algumas PLA₂s básicas Asp-49 também já foram reportadas, a PrTX-III é um exemplo de uma PLA₂ Asp-49 básica (LEE et al., 1999).

Há muitos estudos envolvendo as PLA₂s com características básicas, entretanto não se observa o mesmo em relação as PLA₂s ácidas que não foram ainda completamente caracterizadas. Serrano e colaboradores (1999) caracterizaram parcialmente a BJ-PLA₂, uma PLA₂ ácida isolada da mesma serpente de interesse neste trabalho, a *Bothrops jararaca* que atuou inibindo a agregação plaquetária (SERRANO et al., 1999). Outra PLA₂ ácida descrita é a BmooPLA₂, isolada da peçonha da serpente de *Bothrops moojeni* que também foi caracterizada por inibir a agregação plaquetária e por produzir edema de pata em camundongos (SANTOS-FILHO et al., 2008). A atividade miotóxica, em PLA₂s ácidas, é em geral baixa ou não pronunciada, diferentemente do que ocorre com as PLA₂s básicas, que mostram relevante miotoxicidade. Niesebon e colaboradores (1986) verificaram que uma PLA₂ ácida isolada da peçonha de *Bothrops alternatus* era capaz de lesar tecidos do fígado, pulmão e coração (NIESEBON et al., 1986).

As fosfolipases A₂ são um componente comumente encontrado nas peçonhas de serpentes. Elas também possuem isoformas, que podem apresentar efeitos farmacológicos semelhantes ou não. A existência de múltiplas isoformas de PLA₂s de peçonhas de serpentes associada a um vasto espectro de atividades farmacológicas está relacionado a um processo acelerado de evolução no qual altas taxas de mutações em regiões codificantes de genes tem permitido o desenvolvimento de novas funções (ZULIANI et al., 2005). Ponce-Soto e colaboradores (2006) descreveram sobre a atividade neurotóxica desempenhada pelas isoformas de PLA₂s isoladas da peçonha de *Bothrops jararacussu*. Denominadas de PLA₂ 6-1 e PLA₂ 6-2, essas enzimas apresentaram massa molecular semelhante à reportada para PLA₂s em geral, de 15 kDa e demonstraram também atividade neurotóxica. Além disso, apresentaram atividade fosfolipásica positiva, possuindo na posição 49 o resíduo de ácido aspártico, ou seja, as duas isoformas são Asp-49 (PONCE-SOTO et al., 2006). Três isoformas ácidas isoladas da peçonha de *Bothrops neuwiedi* foram reportadas por Toyama e colaboradores

(2011), identificadas como P1, P2 e P3. Elas foram avaliadas quanto à atividade miotóxica, no entanto nenhuma delas apresentou-se miotóxica (TOYAMA et al., 2011).

Estudos de proteômica, obtidos a partir de cDNA de glândulas da peçonha de *Bothrops jararaca*, mostram variações quanto à porcentagem de componentes proteicos da peçonha (SAGUCHI et al., 2005). Sousa e colaboradores (2013) evidenciaram pela técnica proteômica, diferenças em relação à porcentagem dos componentes de diferentes espécies de serpentes do gênero *Bothrops*. Entretanto, apesar da diferença observada, os grupos de toxinas mais comuns (metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A₂ e as lectinas tipo-C) mostraram um padrão semelhante, sendo que, em geral, as metaloproteases representam a maior parte das proteínas encontradas nas peçonhas. Para a *Bothrops jararaca* (Fig.3) cerca de 40% da peçonha é representada pelas metaloproteases, 24% por lectinas like e apenas 3% por fosfolipases A₂, diferente do que se observa para a peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*, que apresenta cerca de 20% de fosfolipase A₂ e apenas 20% de metaloproteases compondo a peçonha (SOUSA et al., 2013).

Figura 3. Distribuição das proteínas em porcentagem (%) encontradas na peçonha da serpente *Bothrops jararaca* obtida a partir da técnica proteômica. SVMPS (metaloproteases); SVSPs (serinoproteases); CLECL (lectinas like tipo-C); PLA₂ (fosfolipase A₂); CRISPs (proteínas secretoras ricas em resíduos de cisteína); LAAOs (L-aminoácido oxidases). Adaptado de SOUSA et al. (2013).

Apesar de não representarem o componente mais abundante de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*, as PLA₂s são responsáveis por diversos efeitos

tóxicos e farmacológicos, por mecanismos ainda não completamente esclarecidos (ZELANIS et al., 2012). No envenenamento, elas auxiliam na digestão da presa, além de possuírem potencial miotóxico, neurotóxico, hemolítico, edematogênico, citotóxico, hipotensivo, anticoagulante, inibição/ativação da agregação plaquetária, bactericida e pró-inflamatório (GUTIERREZ e LOMONTE, 2013).

Tem sido reportado o papel chave da atividade catalítica em certos efeitos farmacológicos, entretanto, alguns desses efeitos são desempenhados independentemente da ação catalítica. Essa falta de relação direta entre a atividade enzimática e o potencial farmacológico, faz dos mecanismos pelos quais as fosfolipases A_2 atuam uma questão intrigante e que vem sendo estudada (KINI e EVANS, 1989).

1.5 - svPLA₂s e o Processo Inflamatório

Durante a reação de hidrólise de uma PLA₂, são formados ácidos graxos livres e lisofosfolipídios, como já citado anteriormente. Ácidos graxos liberados, como o ácido araquidônico (AA) e o ácido oleico (AO), são importantes fontes de energia, além de atuarem como mensageiros secundários e como precursores de eicosanoides, que são potentes mediadores de inflamação e de transdução de sinal. Os lisofosfolipídios também formados na reação de catálise são relevantes na sinalização celular e no remodelamento de fosfolipídios (SIX e DENNIS, 2000).

A atividade enzimática, agora denominada de atividade de PLA₂, foi primeiramente descrita em 1890, utilizando como fonte de estudo peçonhas de serpentes e desde então, as svPLA₂s têm sido amplamente pesquisadas para se entender melhor as características dos envenenamentos (inflamação, edema, necrose, citotoxicidade) e para a formulação de soros antiofídicos mais eficientes (BURKE e DENNIS, 2009; SIX e DENNIS, 2000).

As manifestações clínicas em acidentes envolvendo as serpentes peçonhentas são variadas e estão relacionadas com as diferentes características da peçonha de serpentes de diferentes espécies. Em envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops*, a inflamação e a necrose são as manifestações mais proeminentes e que são decorrentes em parte da ação de PLA₂s. Muitos pesquisadores têm reportado o isolamento e a caracterização funcional de PLA₂s em peçonhas de serpentes desse mesmo gênero. Em muitos desses estudos, as PLA₂s purificadas mostraram-se pró-inflamatórias e essa atividade têm sido bastante pesquisada ao longo dos anos (TEIXEIRA et al., 2003).

A inflamação é definida como uma reação a uma injúria causada a um tecido, uma resposta protetora do organismo para manter a homeostasia do sistema. Esse processo envolve alterações funcionais de microvasos o que leva a acumulação de fluidos e leucócitos nos tecidos extravasculares e também dor local. A resposta imediata a um agente agressor, definida como inflamação aguda, inclui alterações no calibre vascular e no fluxo sanguíneo, alterações estruturais na microcirculação que favorecem o extravazamento de proteínas do plasma e leucócitos, a migração de leucócitos (inicialmente neutrófilos) a partir da microcirculação e sua acumulação no foco da lesão, seguido por fagocitose pelas células competentes. A etapa de reparo da inflamação envolve a diminuição dos agentes pró-inflamatórios e a

liberação de mediadores químicos anti-inflamatórios (por macrófagos principalmente) e remoção de fluidos e detritos celulares pelo sistema linfático (VANE e BOTTING, 1987).

A exposição das células aos patógenos e a lesão tecidual resultam na produção e na liberação de diversos mediadores químicos, responsáveis pelas características da área inflamada. Dentre várias funções, eles induzem os sinais e sintomas da inflamação, aumentando a permeabilidade vascular e provocando dor, vasodilatação e quimiotaxia de células de defesa. Esses mediadores químicos podem ter origem no plasma ou nas células. Dentre os mediadores da inflamação, encontram-se histamina, metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), fator de ativação plaquetária, bradicinina, óxido nítrico, neuropeptídeos e citocinas. Os principais mediadores que estão envolvidos no processo inflamatório são os eicosanoides, o ácido araquidônico, os prostanoides (prostaciclina, prostaglandinas e tromboxanos), o óxido nítrico e as citocinas (TEIXEIRA et al., 2003).

Os eicosanoides podem mediar vários passos da inflamação, eles são derivados do ácido linoleico e incluem prostanoides (formados por meio da via das ciclooxigenases), leucotrienos, lipoxinas, hepoxilinas, entre outros. O ácido araquidônico é o maior precursor de eicosanoides (TEIXEIRA et al., 2003).

O ácido araquidônico livre pode ser metabolizado por duas classes principais de enzimas: pelas ciclo-oxigenases (COX), sendo a isoforma COX-2 a envolvida na inflamação, iniciando a biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos (prostanoides) e pelas lipo-oxigenases (LOX), originando a biossíntese de leucotrienos (LT) (BOTTING, 2006).

Na família das PLA₂s, três delas estão envolvidas na estimulação da formação do ácido araquidônico, as PLA₂s citoplasmáticas do grupo IV e as secretadas dos grupos II e V (TEIXEIRA et al., 2003).

Os prostanoides (prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina) possuem ação vasodilatadora, além de potencializar os efeitos quimiotáticos e aumentar a permeabilidade de outros mediadores. As prostaglandinas também são vasodilatadoras, além de contribuir para a formação de edema. Além disso, as prostaglandinas também estão envolvidas na patogenia da dor e da febre durante a inflamação (SMITH et al., 2000).

O óxido nítrico (NO), produzido principalmente pelas células endoteliais do tecido lesionado, possui potente ação vasodilatadora, aumentando a permeabilidade vascular. Ele também atua como regulador do recrutamento de leucócitos e exerce ação citotóxica contra micro-organismos. É sintetizado pela NO sintase (NOS), enzima presente em três isoformas, sendo a forma indutível (iNOS) a envolvida nas reações inflamatórias. Esta é induzida em macrófagos e em outras células durante o processo (SAUTEBIN, 2000).

Durante as reações imunes e inflamatórias, as citocinas são liberadas e controlam a ação das células destes sistemas, podendo-se citar as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e β (Fator de Necrose Tumoral α e β) e IL-1 (Interleucina-1), liberadas por macrófagos ativados e vários outros tipos celulares (DINARELLO, 1996). Estas citocinas favorecem a aderência leucocitária ao endotélio, aumentam a síntese de prostaciclina e desencadeiam uma cascata de citocinas secundárias, dentre outras ações. Já as citocinas secundárias (por exemplo, as quimiocinas) atraem e ativam as células inflamatórias móveis. Na reação inflamatória há também a ação de mediadores lipídicos, derivados do metabolismo do ácido araquidônico pelas vias da 5-LO e COX-1 e 2 (LUSTER, 1998).

As citocinas são moléculas proteicas que enviam diversos sinais com função de estimulação, modulação ou mesmo inibição para as diferentes células do sistema imunológico, atuando como coadjuvantes na reparação do processo inflamatório. Em muitos estudos sobre inflamação, utiliza-se a dosagem de citocinas para avaliar esse processo, sendo que as interleucinas (IL) e o os fatores de necrose tumoral (TNF) são os mais reportados (DINARELLO 2011; HARLEY, 1964).

Dentre as ILs, que controlam a inflamação pode-se citar as seguintes: IL-1, IL-6 e IL-10. A IL-1 é produzida prioritariamente por monócitos e macrófagos e atua estimulando as células CD4, a proliferação e ativação de linfócitos B, neutrófilos, monócitos e macrófagos, além de aumentar as atividades quimiotáticas e fagocitárias (KIM et al., 2005; SCHMITZ et al., 2005).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica e interfere nas respostas imune antígeno específicas e reações inflamatórias, representando um dos principais mediadores da fase aguda da inflamação. Ela é capaz de estimular a produção de proteínas da fase aguda do processo inflamatório, além de atrair eosinófilos para o local (BLOM et al., 1997; CHEN et al., 2006).

A IL-10 é produzida basicamente por células CD8 ativadas, linfócitos B, mastócitos e monócitos. Ela é uma citocina anti-inflamatória e inibe a síntese de outros citocinas, dentre elas a IL-2, IL-12 e TNF- β . A IL-10 também atua como coestimulador no crescimento dos timócitos imaturos, agindo como fator de diferenciação celular de células T citotóxicas (STREETZ et al., 2001).

Em relação ao fator de necrose tumoral (TNF), o mais reportado nas pesquisas é o TNF- α , que é sintetizado prioritariamente por macrófagos, monócitos, neutrófilos e células T. A principal atividade dessa citocina é produzir uma acentuada citólise em diferentes linhagens neoplásicas, tendo ação antitumoral importantíssima, sendo o principal mediador na caquexia das neoplasias malignas. As demais ações do TNF são semelhantes às da IL-1, dentre elas, as alterações endoteliais, principalmente a perda da função de diminuição de coagulação, a atividade quimiotática e estímulo ao metabolismo oxidativo de fagócitos (SHIBATA et al., 1999).

O edema é uma manifestação local comumente observada em vítimas de envenenamento por serpentes. A maioria dos estudos relatam a formação ou não de edema em processos inflamatórios induzidos por peçonhas ou PLA₂s isoladas (TEIXEIRA et al., 2003). Gutierrez e colaboradores (1986) verificaram uma reação inflamatória induzida pela peçonha de *Bothrops asper* caracterizada pela formação de edema na pata de camundongos (GUTIÉRREZ et al., 1986). Duas isoformas de PLA₂s purificadas da peçonha de *Crotalus durissus cumanensis* denominadas de Cdc-9 e Cdc-10, também foram reportadas pela indução de edema moderado local (ROMERO-VARGAS et al., 2010). Bleu-TX-III, PLA₂ obtida a partir da peçonha de *Bothrops leucurus* também induziu edema (MARANGONI et al., 2013). A formação de edema é comum, entretanto, pode também não ocorrer, como mostra o estudo de Serrano e colaboradores (1999), que não verificaram edema local após a administração da BJ-PLA₂ presente na peçonha de *Bothrops jararaca* (SERRANO et al., 1999).

Estudos reportados demonstram que, após a aplicação de peçonhas botrópicas, evidenciou-se a migração de leucócitos no local. Gutierrez e colaboradores (1986) mostraram que houve um aumento pouco significativo de leucócitos após 6 horas de administração da peçonha de *Bothrops asper* no músculo gastrocnêmico de camundongos. Entretanto, após 24, 48 e 72 horas de aplicação da peçonha, observou-se um aumento no número dessas células (GUTIÉRREZ et al.,

1986). Também Moreira e colaboradores (2012) evidenciaram uma infiltração de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos após a administração da peçonha de *Bothrops atrox*, entre os períodos de 1 a 8 horas. Além da presença de leucócitos, eles também observaram a produção das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α e eicosanoides (MOREIRA et al., 2012). Após a administração da PLA₂ Bleu-TX-III, a produção das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α também foi verificada, o que mostra o importante papel desempenhado pelas PLA₂s isoladas de peçonhas de serpentes durante a inflamação (MARANGONI et al., 2013).

Ainda não há na literatura estudos que reportam a utilização de fosfolipases A₂ de peçonhas de serpentes como modelo molecular para a formulação de medicamentos para tratar a inflamação, isso devido aos poucos e incompletos estudos de PLA₂s no processo inflamatório. Entretanto, as PLA₂s de peçonhas de serpentes são moléculas com alto potencial farmacêutico uma vez que desempenham relevante atividade pró-inflamatória (SUN et al., 2010).

1.6 - Potencial antitumoral das svPLA₂s

O câncer é uma doença crônica degenerativa, caracterizada pela desordem no crescimento celular dos tecidos, ocorrendo uma multiplicação acelerada e incontrolada de um conjunto de células anormais que perderam a capacidade de apoptose. Em alguns casos, ela é transmitida por uma linha germinativa com mutações no DNA, que podem ocorrer devido a um fator hereditário, por influências do ambiente ou marcas bioquímicas no mesmo (SCOTT et al., 2010).

De acordo com um estudo feito pela Agência Internacional de Pesquisa com Câncer (IARC), são mais de 10 milhões de casos de câncer por ano em todo o mundo. Por outro lado a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, até o ano de 2030, mais de 13 milhões de pessoas irão a óbito pelo câncer (REN et al., 2013).

Estes números expressivos têm estimulado as pesquisas nessa área. Elas vêm tentando entender como e o quê promove a multiplicação descontrolada de células e como os genes desencadeadores de câncer afetam a sinalização celular, a cromatina, a homeostase e o metabolismo do organismo e a maturação de linhagens celulares (CALDERON et al., 2014).

Muitos dos compostos bioativos de novos medicamentos têm como fonte moléculas extraídas e purificadas de peçonhas de serpentes e metabólitos secundários originados de micro-organismos, plantas e outros animais (LEWIS e GARCIA, 2003).

A capacidade que as peçonhas de serpentes possuem de agir em células tumorais é conhecida há anos. Estudos feitos em 1976 em relação à atividade citotóxica foram reportados por Dewys e colaboradores (1976), utilizando um medicamento formulado a partir de um polipeptídeo isolado da peçonha da serpente *Caloselasma rhodostoma* em células tumorais, com o intuito de produzir desfibrinação dessas células. A fibrinólise ajuda a diminuir o tamanho do tumor e a sua disseminação, contribuindo para o tratamento do câncer (DEWYS et al., 1976). Outros pesquisadores também reportaram estudos nessa área. Kaneda e colaboradores (1985) avaliaram o potencial antitumoral de peptídeos denominados de cardiotoxina e citotoxina, isolados da peçonha da serpente *Naja naja atra* (KANEDA et al., 1985). Chiam-Matyas e Ovadia da mesma forma estudaram as propriedades citotóxicas de peçonha bruta de serpentes em linhagens celulares de melanoma maligno (CHAIM-MATYAS e OVADIA, 1987).

Muitos dos componentes das peçonhas de serpentes têm sido estudados separadamente para avaliar o potencial antitumoral e dentre eles, os mais reportados são as desintegrinas (GALAN et al., 2008; McLane et al, 2008; McLane et al., 1998), as LAAOs (COSTA et al., 2014) e as PLA₂s (CALDERON et al., 2014).

As LAAOs são flavoenzimas diméricas, que catalisam a deaminação oxidativa de L-aminoácido em amônia, α -cetoácidos e peróxido de hidrogênio, conhecidas por induzir apoptose em diferentes linhagens tumorais (DU e CLEMETSON, 2002) (FOX, 2013) (KINI e FOX, 2013). Torii e colaboradores (1997) mostraram que a LAAO isolada da peçonha da serpente *Crotalus atrox* induziu apoptose em células embrionárias humanas (293 T), em células pró-mielocíticas leucêmicas (HL-60) e em carcinoma ovariano humano (A2780) (TORII et al., 1997).

As PLA₂s isoladas de peçonhas de serpentes constituem também uma fonte importante de moléculas para a formulação de agentes terapêuticos mais eficazes para o tratamento do câncer. Como já falado, elas são enzimas lipolíticas e as características de alterar a biossíntese lipídica e desregular a lipogênese têm sido exploradas para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (CUMMINGS, 2007; MASHIMA et al., 2009).

Diferentes tipos de PLA₂s vêm sendo reportadas por possuírem propriedades antitumorais e antiangiogênicas, dentre elas as PLA₂s ácidas e básicas além de peptídeos sintéticos derivados de PLA₂s homólogas. Estudos mostram que muitas das PLA₂s isoladas da peçonha das serpentes da família Viperidae tem a capacidade de induzir a atividade antitumoral, o que sugere que essas moléculas podem ser uma nova classe de agentes anticancerígenos (ARAYA e LOMONTE, 2007).

Recentemente, PLA₂s isoladas da peçonha da serpente *Cerastes cerastes*, denominadas de CC-PLA₂-1 e CC-PLA₂-2, foram descritas em relação a capacidade de inibir a adesão e migração de células tumorais, além de impedir a angiogênese tanto *in vivo* quanto *in vitro* (KESSENTINI-ZOUARI et al., 2010; ZOUARI-KESSENTINI et al., 2009). Da mesma forma, Bazaa e colaboradores (2010) mostraram características semelhantes para a MVL-PLA₂, purificada a partir da peçonha de *Macrovipera lebetina transmediterrane*, que inibiu a adesão e migração de células tumorais, bem como a angiogênese (BAZAA et al., 2010).

A BthA-I-PLA₂ isolada da peçonha da serpentes *Bothrops jararacussu* mostrou-se citotóxica em linhagens de células leucêmicas e de tumores de mama (ROBERTO et al., 2004).

Um medicamento foi formulado e está sendo utilizado na prática médica em terapias para tratar o câncer. O VRCTC-310-Onco é um fármaco cujos componentes incluem a crotoxina e a cardiotoxina, duas PLA₂s isoladas de serpentes, *Crotalus durissus terrificus* e *Naja naja atra*, respectivamente (COSTA et al., 1998).

Entretanto, a atividade antitumoral não é observada em todas as PLA₂s do Grupo II o que sugere que a atividade citotóxica não está relacionada com a atividade enzimática, sendo que outro mecanismo pode ser responsável por essa característica (CHWETZOFF et al., 1989).

Ainda hoje, há poucos estudos envolvendo PLA₂s isoladas de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*, no que se remete a inflamação e aos efeitos tumorais. Tanto ensaios de inflamação quanto os de citotoxicidade são poucos e incompletos no que diz respeito às PLA₂s de *Bothrops jararaca*. Entende-se que pesquisas envolvendo esses dois efeitos tornam-se de suma importância, não só para entender melhor o envenenamento dessa serpente, mas também para extrair ferramentas moleculares e biotecnológicas para a formulação de medicamentos mais eficazes tanto para tratar a inflamação quanto para o câncer. Além disso, estes

estudos permitiriam compreender melhor como se dá a interação de moléculas de PLA₂s com os alvos celulares humanos.

OBJETIVOS

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo geral: Isolamento e caracterização funcional de uma fosfolipase A₂ presente na peçonha de *Bothrops jararaca*, avaliando seu potencial antitumoral e inflamatório.

2.2 - Objetivos específicos:

- Isolamento da PLA₂ por diferentes etapas cromatográficas, a partir da peçonha de *Bothrops jararaca*.

- Caracterização bioquímica através do sequenciamento N-terminal, determinação do pI e da massa molar por SDS-PAGE e espectrometria de massas.

- Caracterização funcional por meio das seguintes atividades:

1. Atividade fosfolipásica;

2. Efeito sobre as plaquetas;

3. Avaliar as interações da PLA₂, *in vitro*, nos processos de citotoxicidade pela metodologia do MTT nas linhagens HL-60, HepG2 e linfócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis (PBMC);

4. Avaliar as interações da PLA₂, *in vivo*, em camundongos BALB/c inoculados com a proteína a fim de verificar o potencial inflamatório da mesma, através da avaliação do recrutamento de leucócitos e dosagem das citocinas IL-6, IL-1β, IL-10 e TNF-α, óxido nítrico (NO), proteínas totais e de mediadores lipídicos prostaglandina E₂ e leucotrieno B₄;

MATERIAIS E MÉTODOS

3 - Materiais e Métodos

3.1 - Materiais

3.1.1 - Peçonha e outros materiais

A peçonha bruta da serpente *Bothrops jararaca* (*B.jararaca*) foi gentilmente doada pelo Instituto Butantan, obtida e processada no Laboratório de Herpetologia, da Divisão de Desenvolvimento Científico, lote 01/08-4.

As resinas cromatográficas foram adquiridas da GE Healthcare.

Os demais reagentes necessários para o desenvolvimento do projeto são provenientes da Sigma Chem. Co, GE Healthcare, Biomédica e Thermo Scientific. Os reagentes não especificados são de grau analítico.

3.1.2 - Animais

Para os experimentos de inflamação foram utilizados camundongos BALB/c (25 g), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo – USP campus de Ribeirão Preto. Os testes com os animais foram realizados segundo as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da USP, campus Ribeirão Preto mediante protocolo N° 2012.1.414.53.4.

3.1.3 - Plasma

O plasma humano utilizado nos experimentos de coagulação e efeito sobre plaquetas foi obtido a partir do sangue de voluntários sadios na faixa etária de 20 a 40 anos, de ambos os sexos e que não receberam medicação durante dez dias anteriores aos experimentos.

É importante ressaltar que o presente projeto está de acordo com os termos da Resolução nº 466/12, do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde e demais resoluções complementares à mesma e foi previamente submetido à Comissão de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP (Protocolo CEP/FCFRP nº 353).

3.1.4 - Linhagens celulares

As linhagens celulares tumorais utilizadas ao longo do projeto foram obtidas da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC – *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, USA).

- HL-60 (CCL-240 – ATCC) - leucemia promielocítica humana
- HepG2 (HB- 8065 – ATCC) - carcinoma de fígado humano
- PBMC – Células mononucleares de sangue periférico humano

As células humanas não tumorais (PBMC - Células mononucleares de sangue periférico humano) foram extraídas de sangue periférico de indivíduos saudáveis.

3.2 - Métodos

3.2.1 - Isolamento da fosfolipase A₂ da peçonha de *Bothrops jararaca*

Para o isolamento da PLA₂ da peçonha de *Bothrops jararaca* foram necessários três passos cromatográficos consecutivos, sendo eles: cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S-200, cromatografia de troca iônica em coluna SourceTM 15 Q e cromatografia de troca iônica em coluna MonoQTM 5/50 GL.

3.2.1.1 - Cromatografia de Exclusão Molecular em Sephacryl S-200

Cerca de 200 mg de peçonha bruta liofilizada da serpente *Bothrops jararaca* foram suspensos em 2,0 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 50 mM pH 8,0 e centrifugadas (Centrífuga EBA 12) por 10 minutos a 10.000 xg. O sobrenadante obtido foi aplicado a coluna de dimensões 2,6 x 130 cm contendo resina Sephacryl S-200 que estava previamente equilibrada com AMBIC 50 mM pH 8,0 a um fluxo de 15 mL/h, sendo coletadas frações de 3 mL/tubo. Essas frações foram monitoradas em espectrofotômetro Beckman DU® 640, utilizando o comprimento de onda de 280 nm. Os valores obtidos foram plotados no programa *GraphPad Prism 5* para a obtenção do perfil cromatográfico. De acordo com o perfil

cromatográfico, as frações foram reunidas, separadas em pools e liofilizadas. Todos os pools foram submetidos à avaliação da atividade fosfolipásica e SDS-PAGE, sendo que o pool que apresentou atividade fosfolipásica e massa relativa compatível com PLA₂s foi selecionado e submetido ao próximo passo cromatográfico.

3.2.1.2 - Cromatografia de Troca Iônica em Source™ 15 Q

Cerca de 50 mg do pool selecionado na etapa anterior (item 3.2.1.1.), denominado de pool F (P.F) foi solubilizado em 1,0 mL de tampão Tris 20 mM, pH 8 e submetido a centrifugação por 10.000 xg por 10 minutos utilizando a centrífuga EBA 12. O sobrenadante obtido foi aplicado a coluna Source™ 15Q (11,5 x 2,6 cm) que estava previamente equilibrada com o tampão Tris 20 mM, pH 8 a um fluxo de 1 mL/min, sendo coletadas frações de 3 mL/tubo. A cromatografia foi desenvolvida utilizando o sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, AKTA FPLC, GE Healthcare Life Science). O gradiente de eluição, inicialmente foi de 3 volumes de coluna em 0% do tampão (B) Tris 20 mM, NaCl 1000 mM pH 8, seguindo de 0 – 100% de (B) por 5 volumes de coluna, permanecendo em 100% de (B) em 1 volume de coluna. A absorbância no comprimento de onda de 280 nm foi registrada e os dados obtidos foram plotados no programa *GraphPad Prism 5* para traçar o perfil cromatográfico. De acordo com o perfil cromatográfico, as frações foram reunidas, separadas em pools e liofilizadas. Todos os pools foram submetidos à avaliação da atividade fosfolipásica e SDS-PAGE, sendo que o pool que apresentou atividade fosfolipásica e massa relativa compatível com PLA₂s foi selecionado e submetido ao próximo passo cromatográfico.

3.2.1.3 - Cromatografia de Troca Iônica em Mono Q™ 5/50 GL

Cerca de 1,2 mg do pool selecionado na etapa anterior (item 3.2.1.2) denominado de P.S10, que estava previamente liofilizado, foi suspenso em 550 µL de tampão AMBIC 50mM , pH 8 e submetido à centrifugação em 10.000 xg por 10

minutos utilizando a centrífuga EBA 12. O sobrenadante obtido foi aplicado à coluna Mono QTM 5/50 GL que estava previamente equilibrada com o tampão AMBIC 50 mM, pH 8 a um fluxo de 1 mL/min, sendo coletadas frações de 0,5 mL/tubo. A cromatografia foi desenvolvida utilizando o sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, AKTA FPLC, GE Healthcare Life Science). O gradiente de eluição, inicialmente foi de 20 volumes de coluna em 0% do tampão (B) AMBIC 50 mM, NaCl 1000 mM pH 8, seguindo de 0 – 100% de (B) por 80 volumes de coluna, permanecendo em 100% de (B) em 5 volumes de coluna. A absorbância no comprimento de onda de 280 nm foi registrada e os dados obtidos foram plotados no programa *GraphPad Prism 5* para traçar o perfil cromatográfico. De acordo com o perfil cromatográfico, as frações foram reunidas, separadas em pools e liofilizadas. Todos os pools foram submetidos à avaliação da atividade fosfolipásica e SDS-PAGE, sendo que o pool que apresentou atividade fosfolipásica e massa relativa compatível com PLA₂s foi o selecionado.

3.2.1.4 - Cromatografia em fase reversa em coluna CLC-ODS C18

Para avaliar o grau de pureza do pico obtido na etapa anterior (item 3.2.1.4), denominado de BJ-PLA₂-I, foi feita uma cromatografia de fase reversa. Cerca de 200 µg do pico BJ-PLA₂-I, que estava previamente liofilizado, foram suspensos em 550 µL de solução de ácido tricloroacético (TFA) 0,1% (Solvente A) e submetido a centrifugação a 10.000 xg por 10 minutos utilizando a centrífuga EBA 12. O sobrenadante obtido foi aplicado a coluna Shimadzu C-18 CLC-ODS (250 mm x 4,6 mm) que estava previamente equilibrada com TFA 0,1% a um fluxo de 1 mL/min, sendo coletadas frações de 0,5 mL/tubo. A cromatografia foi desenvolvida utilizando o sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography, HPLC, Shimadzu). O gradiente de eluição seguiu os passos: (0-15 min) de solvente A; (15-65 min) 0-100% Acetonitrila 70% + TFA 0,1% (solvente B) permanecendo por 10 min, retornando ao solvente A em 5 min. A absorbância no comprimento de onda de 280 nm foi registrada e os dados obtidos foram plotados no programa *GraphPad Prism 5* para traçar o perfil cromatográfico. De acordo com o perfil cromatográfico, obteve-se apenas um pico principal, que foi avaliado quanto à atividade fosfolipásica e SDS-PAGE, sendo que o pool que apresentou atividade fosfolipásica e massa relativa idêntica a encontrada na cromatografia anterior (item 3.2.1.3).

3.2.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% foi realizada em condições desnaturantes na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), segundo a metodologia descrita por LAEMMLI (1970). Para a eletroforese em condições redutoras foi utilizado o reagente B-mercaptoetanol.

A corrida do gel foi feita a 120 V e 12 mA. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue G 250* 0,1% (m/v) em água/metanol/ácido acético 40:50:10 (v/v) e descorados com trocas sucessivas de ácido acético glacial a 10% e etanol 5% (v/v).

Foi utilizado como padrão de massas moleculares Thermo (#26610) na faixa de 14,4 a 116,0 kDa, os seguintes padrões: β -galactosidase (116,0 kDa), Soroalbumina bovino (66,2 kDa), Ovoalbumina (45,0 kDa), Lactato desidrogenase (35,0 kDa), REase Bsp98I (25,0 kDa), β -lactoglobulina (18,4 kDa) e Lisoenzima (14,4 kDa).

3.2.3 - Determinação da Concentração Proteica

A quantificação de proteína foi realizada pelo método descrito por SCOPES (1974), pelo qual são feitas leituras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 205 nm e 280 nm e os valores obtidos são inseridos na fórmula abaixo, obtendo-se o valor da concentração proteica em mg/mL (SCOPES, 1974).

$$\text{Concentração (mg/mL): } \frac{\text{Abs 205}}{27 + 120 (\text{Abs 280/Abs 205})}$$

Onde Abs = Absorbância

A determinação da concentração de proteínas na recuperação foi realizada baseando-se no método do ácido bicinonínico (BCA) conforme o protocolo do Kit **Pierce BCA Protein Assay Kit** utilizado.

3.2.4 - Caracterização Bioquímica

3.2.4.1 - Determinação da Massa Molecular

A massa molecular da PLA₂ isolada da peçonha de *Bothrops jararaca* foi determinada por SDS-PAGE e por Espectrometria de Massas com Ionização e Dessorção a laser assistida por Matriz com analisador por tempo de voo (MALDI-TOF MS).

3.2.4.1.1 - Determinação da Massa Molecular por SDS-PAGE

A SDS-PAGE da PLA₂ isolada da peçonha de *Bothrops jararaca* foi realizada de acordo com o item 3.2.2 descrito.

3.2.4.1.2 - Determinação da Massa Molecular por MALDI-TOF MS

Para a determinação da massa molecular da PLA₂ foi utilizado o espectrômetro de massas tipo duplo TOF com fonte MALDI (MALDI-TOF/TOF, modelo *AXIMA Performance*, Shimadzu Biotech, Manchester, UK) e os espectros de massa foram adquiridos no modo linear positivo. Foi feita uma calibragem do aparelho com padrões de proteína incluindo BSA, insulina, citocromo c, ribonuclease, apomiglobina e aldolase. As amostras foram diluídas em 50 µL de água Milli-Q e misturadas na proporção de 1:1 com a matriz composta de ácido sinapínico (10 mg/mL) em acetonitrila 50% e TFA 0,1%, e aplicadas na placa do MALDI, sendo que a faixa de massas moleculares avaliada foi de 3.000-100.000 m/z.

Esta análise foi realizada no Centro de Química de Proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto em colaboração com o Prof. Dr. José César Rosa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.2.4.2 - Focalização Isoelétrica

A focalização isoeletrica foi feita segundo o método descrito por VESTERBERG (1972), com pequenas modificações. Inicialmente, as placas foram tratadas e o gel foi preparado a 7% (m/v) em poliacrilamida (bis-acrilamida: acrilamida 0,8:30, m/m), contendo 10% (m/v) de sacarose, 1% (v/v) de anfólito pH

3,0-10,0 (*Pharmalyte*, Sigma-Aldrich), 0,17% (v/v) de TEMED (N,N,N',N' -tetrametiletilenodiamina) e 0,075% (m/v) de persulfato de amônio. A solução a ser polimerizada foi adicionada a um sistema constituído por uma placa fina de vidro de 18 x 11 cm, montada entre duas placas grossas do mesmo tamanho fixadas por meio de pinças metálicas. Ao final da polimerização do gel, as placas grossas foram retiradas e a placa fina foi usada como suporte para o gel. A placa fina foi então colocada sobre uma placa de porcelana refrigerada ligada a um banho termostaticado a 4°C (sistema *Multiphor™ II*, GE Healthcare). Duas tiras de papel foram utilizadas para conectar o gel e os eletrodos de platina, sendo o cátodo embebido em uma solução de hidróxido de sódio 1 M e o ânodo em ácido fosfórico 1 M. Os eletrodos de platina foram centralizados sobre as tiras de papel e o sistema foi então fechado. A fonte de alta voltagem (modelo *Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL*, GE Healthcare) foi ajustada para valores de 2000 V, 20 mA e 500 V.h para a realização de uma pré-focalização por 30 minutos. Após, as amostras (10 µL) foram aplicadas diretamente no gel com a utilização de um pente e a focalização prosseguiu por aproximadamente 4 horas a 2000 V, 20 mA e 3000 V.h. Os padrões de focalização isoeletrica (*IEF Standards*, faixa de pI 4,45-9,6, Bio-Rad) foram corridos em paralelo às amostras nas mesmas condições.

Ao final da focalização isoeletrica, desprezou-se 0,5 cm das laterais do gel e tiras de 1,0 x 2,0 cm foram cortados do mesmo, sendo colocadas em tubos de ensaio contendo 0,5 mL de água Milli-Q para leitura do pH após 12 horas em repouso. Estas tiras foram cortadas nas laterais do gel intercaladamente, de forma a obter valores de pH para cada 0,5 cm do gel. Uma curva de pH versus a distância de migração no gel para o cálculo do pI das amostras foi feita. O restante do gel contendo as amostras foi fixado em solução de ácido tricloroacético a 20% (m/v) por 30 minutos e, após sucessivas lavagens com água Milli-Q, foi corado com azul de coomassie G-250 0,1% (m/v) dissolvido em água Milli-Q: metanol: ácido acético (40:50:10, v/v) e descorado em solução de ácido acético 10% e metanol 5%.

3.2.5 - Caracterização Estrutural

3.2.5.1 - Sequenciamento N-Terminal

O sequenciamento N-terminal foi feito utilizando o sequenciador automático de proteínas (Sistema PPSQ-33A) pelo método de degradação descrito por Edman

(EDMAN e BEGG, 1967). Este método envolve 3 etapas, sendo a primeira o acoplamento seguida de clivagem e conversão. Após os procedimentos de purificação, a proteína foi aplicada diretamente em uma membrana de fibra de vidro (Wako, Japão), na concentração final de 200 pmol. Em seguida, o sequenciador automático procedeu à análise da estrutura primária da PLA₂. O aminoácido derivado da reação com o fenilisotiocianato (PITC) foi convertido em feniltiohidantoína (PTH)-aminoácido e separado cromatograficamente em RP-HPLC. A quantificação e identificação das amostras foram realizadas pela comparação com padrão de 25 pmol analisado no início do sequenciamento. Este experimento foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Eliane C. Arantes Braga da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.2.5.2 - Sequenciamento de peptídeos trípticos

A amostra de PLA₂ previamente suspensa em água MilliQ foi submetida à digestão enzimática com tripsina (Promega). A amostra foi tratada com uma solução de tripsina a 0,5 µg/20µL e incubada a 37°C por 24 h. A reação foi interrompida pela adição de 5 µL de ácido fórmico e mantida em temperatura ambiente para a extração dos peptídeos. O extrato foi conservado em freezer (-20°C) até o momento da análise por espectrometria de massas.

Os peptídeos trípticos das amostras foram preparados em coluna *ZipTip* contendo resina de fase reversa (POROS R2, Perseptive Biosystems, USA) previamente ativada com metanol e equilibrada com ácido fórmico a 0,2%. A amostra foi carregada na coluna e purificada de sais e outros componentes hidrofílicos por 3 lavagens com 100 µL de ácido fórmico a 0,2%, sendo os peptídeos eluídos da resina com 30 µL de uma solução de metanol 60% em ácido fórmico 5%.

Neste solvente, a amostra foi diretamente analisada por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI MS) ou foram secas para que pudessem ser diluídas em matriz apropriada no caso de análise por MALDI-TOF MS. Os peptídeos trípticos foram analisados em espectrômetro de massas tipo eletrospray triplo-quadrupolo (Quattro II, Micromass, Manchester, UK) utilizando uma origem eletrospray do tipo *nanoflow* contendo um capilar de sílica fundida de 75 µm de diâmetro interno, mantido a 4 kVolts e 40 V no cone de entrada e a uma temperatura de 100°C. A amostra foi introduzida por uma bomba tipo seringa (Harvard, Inc, USA)

a um fluxo de 300 nL/min e os espectros de massa foram coletados na forma de média de scans (15-30 scans) e processados com o software *MassLynx* v. 3.3 (Micromass, Manchester, UK). A coleta de dados de massa utilizou varredura em MS1 (400-1500 u.m.a) obtendo-se assim a determinação da massa dos peptídeos (*peptide mass fingerprint*). Cada íon de peptídeo detectado foi submetido a CID-MS/MS (*daughter ion scanning*) que promove a fragmentação do íon selecionado por colisão com argônio na pressão parcial de $3,0 \times 10^{-3}$ mBar e energia variando entre 20-30 eV, originando fragmentos de íons do tipo *b* e *y* que foram utilizados para a dedução das respectivas sequências de aminoácidos dos peptídeos pelo programa *Biolynx* (Micromass, Manchester, UK).

Para as análises em MALDI-TOF/TOF utilizou-se um espectrômetro de massas tipo duplo TOF com fonte MALDI (AXIMA Performance, Shimadzu Biotech, Manchester, UK). A amostra foi diluída em solução contendo ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL) e aplicadas manualmente na placa de MALDI, que foi então deixada a temperatura ambiente para cristalização completa da matriz. Em seguida, a avaliação das amostras foi feita no modo automático.

Os dados gerados por MS foram submetidos aos bancos de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information* / www.ncbi.nlm.nih.gov) e Swiss-Prot utilizando os sites BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e MASCOT (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) na tentativa de identificar sequências homólogas de proteínas para fins comparativos.

Essa análise foi realizada no Centro de Química de Proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto em colaboração com o Prof. Dr. José César Rosa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.2.5.3 - Alinhamento Múltiplo das Sequências Parciais Obtidas

Para a análise comparativa das sequências parciais de aminoácidos da PLA₂ com outras obtidas nos bancos de dados NCBI e Swiss-Prot utilizando os sites BLAST e MASCOT, foi feito um alinhamento múltiplo utilizando o programa *ClustalX* versão 2.0.11. (<http://www.clustal.org/>).

3.2.6 - Caracterização Funcional

3.2.6.1 - Determinação da Atividade Fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi feita com base no método descrito por Gutiérrez e colaboradores (1988), modificando agarose por agar e sem utilizar eritrócitos. O experimento consiste na elaboração de aproximadamente 30 mL de gel contendo CaCl_2 0,01M, gema de ovo diluída em PBS (pH 7,2) na proporção 1:3 (v/v), ágar bacteriológico 1% e azida de sódio 0,005%. Após a solidificação do gel em placas de petri, orifícios de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro foram feitos e as amostras foram aplicadas em volume final de 50 μL . As placas contendo a BJ-PLA₂-I em diferentes concentrações (50; 25; 12,5; 6; 3; 0,16 $\mu\text{g/mL}$) foram incubadas em estufa a 37°C por 12 horas. Também se incubou um controle positivo (peçonha bruta de *Bothrops jararaca* 50 $\mu\text{g/mL}$) e um controle negativo (PBS). A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel foi considerada como indicativo de atividade, medindo-se os halos em centímetros para a quantificação da atividade fosfolipásica. Foi considerada como a concentração fosfolipásica mínima aquela capaz de produzir halo de 2 cm.

3.2.6.2 - Efeito sobre plaquetas

A determinação da atividade de inibição da agregação plaquetária foi baseada no método turbidimétrico de BORN (1963). Esse método está fundamentado na variação da densidade óptica do plasma rico em plaquetas (PRP) produzido pela adição de um agonista, por exemplo, a Adenosina Difosfato (ADP). Para a realização do teste foi utilizado o protocolo descrito para o agonista utilizado, (ADP) Biomédica.

Para o teste, foi coletado sangue de doadores sadios por punção venosa em tubos de 5 mL contendo citrato de sódio 3,8% (9:1, v/v). A seguir, o sangue foi centrifugado em centrífuga FANEM a 200 $\times g$ em temperatura ambiente por 10 minutos para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP), pela coleta do plasma sobrenadante. Os mesmos tubos utilizados anteriormente foram novamente centrifugados a 2000 $\times g$ em temperatura ambiente por 15 minutos para obtenção de plasma pobre em plaquetas (PPP), pela coleta do plasma sobrenadante. Após a coleta do sangue, o teste foi feito em um período de no máximo 3 horas.

A contagem das plaquetas no plasma foi feita em câmara de Neubauer obtendo-se um valor aproximado de 250.000 plaquetas/mL.

Para os testes utilizou-se o Agregômetro CHRONO LOG® modelo 490, de dois canais e os dados obtidos foram analisados pelo software AggroLink®. Inicialmente, foi realizada uma curva dose resposta do agonista selecionado para a agregação plaquetária. O ADP foi usado como indutor da agregação e duas concentrações foram testadas, 5 e 10 μM (concentração final).

Foram utilizados 500 μL de PRP o qual foi incubado a 37 °C por 5 minutos. Findo esse tempo, foi adicionado 2,5 μL de ADP (5 μM) e 5,0 μL de ADP (10 μM) a cada cubeta. A concentração que apresentou porcentagem de agregação satisfatória foi selecionada. As amostras foram solubilizadas em água, obtendo-se um volume final de 50 μL . Para avaliar a atividade de agregação plaquetária da amostra de interesse utilizou-se 450 μL de PRP, incubados a 37 °C por 5 minutos, e adicionou-se 50 μL da amostra. Avaliou-se a inibição da agregação por 11 minutos. A porcentagem de agregação foi calculada em função da densidade óptica, que pode aumentar ou diminuir de acordo com a amostra. À medida que a agregação plaquetária ocorre a densidade óptica aumenta, entretanto, diminui se ela não ocorrer.

3.2.6.3 - Análise do Exsudato Inflamatório Peritoneal

Grupos de 4 camundongos BALB/c machos foram injetados via intraperitoneal com 300 μL de PLA₂ em diferentes concentrações (5,0; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g/mL}$) diluídas em PBS estéril, sendo que o grupo controle recebeu 300 μL de PBS estéril. Após 4 horas os animais foram submetidos à eutanásia pela instilação de CO₂ e para a análise das células inflamatórias, a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de PBS gelado. Em um segundo experimento, grupos de 5 camundongos BALB/c machos foram injetados via intraperitoneal com 300 μL de PLA₂ em uma única concentração de 10,0 $\mu\text{g/mL}$ (equivalente a uma dose de 0,12mg/Kg) diluída em PBS estéril, sendo que o grupo controle recebeu 300 μL de PBS estéril. Após 2, 4 e 24 horas os animais foram submetidos à eutanásia pela instilação de CO₂ e para a análise das células inflamatórias, a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de PBS gelado. O líquido peritoneal foi coletado com auxílio de seringa e agulha estéril e transferido para tubos plásticos de 15 mL, que foram centrifugados a 200 $\times g$ por 10 min e em seguida mantidos em banho de gelo. O sobrenadante foi estocado a – 20°C para a dosagem de citocinas, e o *pellet* resuspendido em 500 μL de PBS estéril gelado para

a contagem de células totais e diferenciais. As células peritoneais totais (leucócitos) foram contadas em Câmara de *Neubauer* diluídas em solução de *Turk* (1/20). A contagem diferencial dos leucócitos em neutrófilos e células mononucleares foi feita com amostras de células do lavado peritoneal (100 μ L), que foram concentradas em lâminas de microscópio utilizando citocentrífuga (*Cytospin 3*, Shandon Souther Products Ltd., UK), coradas com corante de *Romanowsky* e analisadas em microscópio óptico (Bioval), magnificação 400X. Foram contadas 100 células por lâmina e os resultados foram expressos em 10^3 céls/mL (MENALDO et al., 2013; ZOCCAL et al., 2013).

3.2.6.4 - Dosagem indireta de óxido nítrico (NO) pela reação de Griess

O óxido nítrico (NO) produzido pelas células se decompõe em nitritos (NO_2) e nitratos (NO_3) que ficam presentes no sobrenadante do lavado peritoneal. Para a dosagem de NO_2 foi utilizado o método de ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess (GREEN et al., 1981). Cem microlitros dos sobrenadantes do lavado peritoneal foram incubados com o mesmo volume do reagente de Griess (mistura de 1:1 de uma solução de NEED 0,1% em água destilada com uma solução de sulfanilamida 1% em H_3PO_4 5%) a temperatura ambiente. A concentração de NO_2 foi determinada usando uma curva de 1 a 200 μM NaNO_2 . Os dados foram apresentados como $\mu\text{M/mL}$ de NO_2 .

3.2.6.5 - Quantificação de Citocinas por ELISA

As citocinas (IL6, IL-1 β , IL-10 e TNF- α) foram quantificadas nos sobrenadantes de cultura obtidos do LCP livre de células utilizando o ensaio imunoenzimático (ELISA). Foram utilizados anticorpos específicos (purificados e biotinilados) e proteínas recombinantes, de acordo com instruções do fabricante (R & D Systems, MN, e PharMingen, San Diego, CA). A leitura da densidade óptica foi feita em 490 nm e a concentração de citocinas calculada a partir da curva padrão. Os resultados foram expressos em pg/mL de proteína (ZOCCAL et al., 2013).

3.2.6.6 - Determinação da Concentração de Mediadores Lipídicos

Os mediadores lipídicos Leucotrieno B₄ (LTB₄) e Prostaglandina E₂ (PGE₂) foram quantificados nos fluidos peritoneais livre de células (sobrenadante) dos camundongos BALB/c injetados com PLA₂, pelo ensaio imunoenzimático competitivo de acordo com as instruções do fabricante (EIA, Cayman, USA). Cinquenta microlitros de cada amostra foram colocados em placas previamente sensibilizadas com os anticorpos específicos para LTB₄ e PGE₂ e incubadas a 4°C *overnight*. Após período de incubação as absorbâncias foram determinadas em leitor de placa em 405/420 nm (µQuant, biotek Instruments Inc.). As concentrações dos mediadores foram calculadas a partir da curva padrão. O limite de detecção foi > 13 pg/mL.

3.2.6.7 - Avaliação do Potencial Antitumoral

3.2.6.7.1 - Manutenção da linhagem celular em suspensão (HL-60)

A linhagem HL-60 foi mantida congelada em nitrogênio líquido (-195°C) em alíquotas de 1x10⁶ células/mL em solução de congelamento (10% de DMSO e 90% de soro bovino fetal). Para a realização dos experimentos as células foram descongeladas e cultivadas em monocamada, em frascos de 25 cm² com 5 mL de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). Os frascos contendo as células descongeladas foram incubados em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem o estado de confluência (~5x10⁶ células), quando necessitam de subcultivo.

3.2.6.7.1.1 - Subcultivo da HL-60

O líquido da garrafa de cultura contendo as células e o meio de cultivo foi transferido para um tubo falcon de 15 mL. Feito isso, o material foi centrifugado 900 xg por 5 min, em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuspensionado em RPMI 10% SBF. Em seguida foi feita a contagem do número de células em câmara de *Neubauer* na presença do corante azul de Tripan, depois a suspensão celular foi distribuída em garrafas 75 cm² de meio de cultura com 10 mL de meio RPMI 10% SBF, de modo que cada garrafa recebesse 1x10⁶ células. Novamente as garrafas foram incubadas em estufa umidificada contendo 95% de ar

e 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem o estado de confluência, quando necessitam de novo subcultivo.

3.2.6.7.2 - Manutenção da linhagem celular aderente (HepG2)

A linhagem HepG2 foi mantida congelada em nitrogênio líquido (-195°C) em alíquotas de 1×10^6 células/mL em solução de congelamento (10% de DMSO e 90% de soro bovino fetal). Para a realização dos experimentos as células foram descongeladas e cultivadas em monocamada, em frascos de 25 cm² com 5 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). Os frascos contendo as células descongeladas foram incubados em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem o estado de confluência ($\sim 5 \times 10^6$ células), quando necessitam de subcultivo.

3.2.6.7.2.1 - Subcultivo da HepG2

As linhagens aderentes necessitaram de um procedimento diferente da linhagem em suspensão e semi-aderente. Todo o conteúdo do frasco foi desprezado, permanecendo assim, somente as células aderidas ao fundo do frasco. O frasco foi lavado com aproximadamente 2 mL de tampão PBS estéril pH 7,4 que posteriormente foi descartado. Em seguida, adicionou-se 2 mL de tripsina (0,25%) à garrafa de cultura. O período de ação da tripsina é de aproximadamente 5 minutos e após este período, a mesma foi neutralizada com meio DMEM 10% SBF, de modo que o volume de meio fosse o dobro do volume usado de tripsina. Após essa etapa transferiu-se todo o conteúdo para um tubo falcon de 15 mL e centrifugou-se por 5 min a 900 xg. Desprezou-se todo o sobrenadante, sendo o pellet ressuspensionado em DMEM com 10% de SBF. Em seguida foi feita a contagem do número de células em câmara de *Neubauer* na presença do corante azul de Tripán, depois a suspensão celular foi distribuída em garrafas 75 cm² de meio de cultura com 10 mL de meio DMEM 10% SBF, de modo que cada garrafa recebesse 1×10^6 células. Novamente as garrafas foram incubadas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem o estado de confluência, quando necessitam de novo subcultivo.

3.2.6.7.3 - Viabilidade celular

Para a análise dessa atividade foi utilizado o método de brometo 3 - [4,5-dimetil-tiazol - 2-il] - 2,5 - difenil-tetrazólio (MTT), descrito por Mosmann em 1983 que demonstra a viabilidade das células após tratamento com um agente citotóxico (MOSMANN, 1983).

Antes da realização de qualquer experimento foi feito o teste de viabilidade das células a serem usadas, para garantir a veracidade dos resultados. O teste foi realizado com o corante azul de Tripán. O corante é incorporado por células com membranas fragilizadas, indicando que as células já possuem um estágio de morte avançado. O corante azul de Tripán é usado na proporção de 1:1, pipetando 10µL de corante para 10µL de suspensão de células e esperados 15 minutos para a leitura no microscópio. As células viáveis não são coradas pelo azul de Tripán e aparecem incolores, ao passo que as células mortas apresentam coloração azul. O resultado foi expresso pela equação:

$$\% \text{ de células viáveis} = [(células \text{ viáveis} / \text{total de células}) \times 100]$$

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas as culturas com viabilidade por azul de Tripán igual ou superior a 98%.

3.2.6.8 - Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos pelas médias dos valores e desvios padrões (SD). A significância estatística dos resultados foi avaliada com o programa *GraphPad Prism 5* utilizando teste t de Student ou análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey, considerando os valores de $p < 0,05$ como significativos.

RESULTADOS

4 - Resultados

4.1 - Isolamento da Fosfolipase A₂ da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*

O isolamento da PLA₂ da peçonha da serpente de *Bothrops jararaca* consistiu em 3 passos cromatográficos, sendo eles: cromatografia de exclusão molecular (coluna Sephacryl S-200), cromatografia de troca iônica (coluna SourceTM 15Q) e cromatografia de troca iônica (coluna Mono Q TM 5/50 GL).

No primeiro passo, cromatografia em Sephacryl S-200, a peçonha bruta de *Bothrops jararaca* foi desdobrada em 9 pools separados em picos (A, B, C, D, D1, E, F, G, G1) que foram testados em relação a atividade fosfolipásica e avaliados em eletroforese SDS-PAGE (Fig.4A). O pico F foi selecionado para a próxima etapa por apresentar massa molecular relativa à fosfolipases A₂ e atividade fosfolipásica positiva. Na etapa seguinte, cromatografia em coluna contendo SourceTM 15Q/50 mL o pico F (P.F) foi desdobrado em 10 picos (S1,S2,S3,S4,S5,S6,S7,S8,S9,S10) (Fig.4B), os quais foram submetidos à determinação da atividade fosfolipásica e a eletroforese SDS-PAGE. O pico designado de P.S.10 foi o escolhido para a próxima etapa cromatográfica por apresentar massa molecular relativa à fosfolipases A₂ e atividade fosfolipásica positiva. Na segunda etapa, a banda na eletroforese SDS-PAGE aparece apenas com alguns contaminantes, sugerindo que a amostra está quase pura (Fig.4B). Nessa etapa, retirou-se o sal do pico P.S.10 que foi em seguida, liofilizado e submetido ao próximo passo cromatográfico, em coluna Mono Q TM 5/50 GL (Fig.4C) que demonstra um pico principal, denominado de BJ-PLA₂-I, que foi testado quanto a sua atividade fosfolipásica e submetido à eletroforese SDS-PAGE, obtendo-se uma banda única, tanto na condição desnaturante quanto na condição redutora, o que sugere que a amostra está pura (Fig.4C). A atividade fosfolipásica apresentou-se positiva. Para confirmar o grau de homogeneidade da amostra, foi feita uma cromatografia de fase reversa (coluna C18 CLC-ODS), na qual apenas um pico foi evidenciado, comprovando a pureza da amostra (Fig.4D).

Figura 4. Purificação da BJ-PLA₂-I a partir da peçonha de *Bothrops jararaca*. A) Cromatografia de Exclusão Molecular em Sephacryl S-200. Amostra: 200 mg da peçonha foram suspensas em 2,0 mL de AMBIC 50 mM pH 8,0 e centrifugada a 10.000 xg, sendo que o sobrenadante obtido foi aplicado a coluna. O mesmo tampão foi utilizado para equilíbrio e eluição da coluna, a um fluxo de 15 mL/h, sendo a absorbância monitorada a 280 nm. Também apresenta-se a eletroforese em SDS-PAGE de todas as frações obtidas **B) Cromatografia de Troca Aniônica em SourceTM 15Q.** O pico F (50 mg) foi solubilizado em 1,0 mL de tampão Tris 20 mM, pH 8, centrifugado a 10.000 xg por 10 min e o sobrenadante aplicado a coluna, equilibrada previamente com o mesmo tampão. Utilizou-se os tampões Tris 20 mM pH 8,0 (tampão A) e Tris 20 mM, NaCl 1000 mM pH 8,0 (tampão B), seguindo o gradiente de eluição: inicialmente 3 volumes de coluna em 0% do tampão (B) Tris 20 mM, NaCl 1000 mM pH 8, seguindo de 0 – 100% de (B) por 5 volumes de coluna, permanecendo em 100% de (B) em 1 volume de coluna. A cromatografia foi desenvolvida em fluxo de 1 mL/min e a absorbância foi avaliada a 280 nm. A SDS-PAGE apresentada corresponde (1) ao Padrão de Massa Molecular e (2) ao Pico S.10. **C) Cromatografia de Troca Aniônica em Mono QTM 5/50 GL.** Cerca de 1,2 mg do pool selecionado na etapa anterior (P.S10), que estava previamente liofilizado, foi suspenso em 550 µL de tampão AMBIC 50mM , pH 8 e submetido à centrifugação em 10.000 xg por 10 min. O sobrenadante obtido foi aplicado a coluna Mono QTM 5/50 GL, a qual estava previamente equilibrada com o mesmo tampão de suspensão da amostra. Utilizou-se os tampões AMBIC 50 mM pH 8,0 (tampão A) e AMBIC 50 mM, NaCl 1000 mM pH 8,0 (tampão B) seguindo o gradiente de eluição: inicialmente 20 volumes de coluna em 0% do tampão (B) AMBIC 50 mM, NaCl 1000

mM pH 8, seguindo de 0 – 100% de (B) por 80 volumes de coluna, permanecendo em 100% de (B) em 5 volumes de coluna, em um fluxo de 1 mL/min e a absorbância foi avaliada a 280 nm. A SDS-PAGE apresentada corresponde (1) ao Pico BJ-PLA₂-I (2) ao Pico BJ-PLA₂-I com β -mercaptoetanol **D) Cromatografia de Fase Reversa em Coluna C18 CLC-ODS.** A BJ-PLA₂-I foi aplicada a coluna, utilizando-se TFA 0,1% (Solvente A) e ACN 70% + TFA 0,1% (Solvente B) no seguinte perfil de eluição: (0-15 min) de solvente A; (15-65 min) 0-100% Acetonitrila 70% + TFA 0,1% (solvente B), permanecendo em 100% de solvente B por 10 min e retornando ao solvente A em 5 min, a um fluxo de 1 mL/min, sendo a absorbância monitorada a 280 nm. A SDS-PAGE apresentada corresponde (1) a BJ-PLA₂-I (2) a BJ-PLA₂-I com β -mercaptoetanol. Os padrões utilizados na eletroforese em SDS-PAGE foram: β -galactosidase (116,0 kDa), Soroalbumina bovino (66,2 kDa), Ovoalbumina (45,0 kDa), Lactato desidrogenase (35,0 kDa), REase Bsp98I (25,0 kDa), β -lactoglobulina (18,4 kDa) e Lisoenzima (14,4 kDa).

4.1.1 - Recuperação do processo de purificação da BJ-PLA₂-I

A Tabela 3 mostra a recuperação do processo de purificação da BJ-PLA₂-I.

Tabela 3. Recuperação proteica do processo de purificação da BJ-PLA₂-I

Etapa da Purificação	Proteína Total (mg)	Rendimento (%)
Peçanha Bruta <i>B.jararaca</i>	144,2 mg^a	100
Sephacryl S-200 (P.F)	15,2 mg^a	10,5
Source[™] 15Q (P.S.10)	1,2 mg^a	0,8
Mono Q[™] 5/50 GL (BJ-PLA₂-I)	0,28 mg^a	0,2

^a.Concentração proteica determinada pelo método BCA.

4.2 - Determinação da Massa Molecular

4.2.1 - Por SDS-PAGE

A massa molecular da BJ-PLA₂-I foi determinada por SDS-PAGE, sendo aplicado ao gel 10 µg da proteína.

A estimativa da massa molecular foi feita pela interpolação de uma curva logarítmica linear da massa molecular relativa das proteínas do padrão versus a distância de migração no gel, obtendo-se uma massa aproximada de 14,8 kDa (Fig. 5).

Figura 5. Determinação da massa molecular da BJ-PLA₂-I. Para determinar a massa molecular relativa foi feita uma curva logarítmica da massa molecular versus a distância de migração no gel de eletroforese SDS-PAGE, sendo o valor de 14,8 kDa o encontrado. Os padrões de massa molecular utilizados foram: β-galactosidase (116,0 kDa), Soroalbumina bovina (66,2 kDa), Ovoalbumina (45,0 kDa), Lactato desidrogenase (35,0 kDa), REase Bsp98I (25,0 kDa), β-lactoglobulina (18,4 kDa) e Lisoenzima (14,4 kDa).

4.2.2 - Por Espectrometria de massas MALDI-TOF-TOF MS

A massa molecular da BJ-PLA₂-I também foi determinada por espectrometria de massas MALDI-TOF-TOF MS, pelo modo linear. Obteve-se um valor de 14.276,5 Da ou 14,2765 kDa (Fig. 6), compatível com a massa encontrada na determinação

por eletroforese SDS-PAGE.

Figura 6. Determinação da massa molecular da BJ-PLA₂-I por MALDI-TOF-TOF MS. Espectro obtido em modo linear positivo do espectrômetro de massas tipo duplo TOF com fonte MALDI.

4.3 - Determinação do ponto isoelétrico (pI)

A partir do teste de focalização isoelétrica da BJ-PLA₂-I verificou-se que se trata de uma proteína ácida, tendo um pI aproximado de 4,4 (Fig. 7), conforme determinado pela curva de pH versus a distância de migração no gel.

Figura 7. Focalização isoeétrica da BJ-PLA₂-I. O pI da PLA₂ foi calculado pela curva de pH versus a distância de migração no gel e em paralelo padrões de focalização isoeétrica (*IEF Standards*, faixa de pI 4,75 – 6,8 Bio-Rad) foram corridos em condições idênticas.

4.4 - Sequenciamento Parcial da BJ-PLA₂-I

Para a obtenção da sequência parcial da BJ-PLA₂-I foi utilizado o método de degradação de Edman e a digestão trípica. Nos dois métodos utilizados foram obtidos 60 resíduos de aminoácidos referentes à sequência N-terminal, incluindo os digestos trípticos que quando alinhados foram compatíveis com a sequência N-terminal.

Para comparar a sequência obtida com outras sequências provenientes do banco de dados do NCBI, foi feito um alinhamento múltiplo (Fig. 8), que levou em consideração as prováveis posições dos peptídeos trípticos e o número total de aminoácidos esperado para a PLA₂, utilizando o programa *Clustal X2*.

Figura 8. Alinhamento múltiplo da sequência parcial de aminoácidos da BJ-PLA₂-I com sequências de outras fosfolipases A₂ de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*. Os resíduos de aminoácidos destacados em azul são cisteínas que fazem parte de pontes dissulfeto (azul) e os que pertencem ao sítio catalítico estão em vermelho (vermelho). Os espaçamentos (ou Gaps) estão indicados por “-” enquanto que “*” indica o

posicionamento que apresenta um único e completo resíduo conservado. O sinal “.” indica que grupos de aminoácidos relacionados estão fortemente conservados e o sinal “:” indica que grupos de aminoácidos relacionados estão fracamente conservados. Dentre as toxinas selecionadas para o alinhamento, foram citadas: BJ-PLA₂ (gi: 3914258) (Serrano et al., 1999), BaspPLA₂-II (gi: 3914258) (Fernandez et al., 2010), BI-PLA₂ (gi: 357580468) (Nunes et al., 2011), BpirPLA₂-I (gi: 357580469) (Teixeira et al., 2011) e BmooPLA₂ (gi: 403399514) (Santos-Filho et al., 2008).

4.5 - Atividade Fosfolipásica

A BJ-PLA₂-I apresentou alta atividade fosfolipásica, mesmo em baixa concentração (0,16 µg/mL) (Fig. 9). A concentração fosfolipásica mínima foi calculada, sendo determinado o valor de 50 µg/mL.

Figura 9. Atividade fosfolipásica. A atividade fosfolipásica da BJ-PLA₂-I isolada foi determinada pelo método descrito no item 3.2.6.1. Ela apresentou alta atividade fosfolipásica, sendo a mesma avaliada em diferentes quantidades (50; 25;12,5; 6; 3 e 0,16 µg/mL). O CN representa o controle negativo: PBS. CP representa o controle positivo: 300 µg/mL de peçonha bruta de *Bothrops jararaca*.

4.6 - Efeito sobre as plaquetas

Para a inibição da agregação plaquetária com a BJ-PLA₂-I foi utilizada uma concentração de 20,5 µg/mL, sendo que o teste foi monitorado por 9 minutos.

Inicialmente, avaliou-se a potência do agonista, sendo utilizado o ADP em duas concentrações distintas, 5 µM e 10 µM. Para o ADP, obteve-se as seguintes

porcentagens de agregação 84% e 87% de agregação plaquetária, nas respectivas concentrações. Como a diferença entre os valores do ADP foram pequenas, optou-se por utilizar o ADP a 5 μ M nas determinações da amostra.

A BJ-PLA₂-I foi capaz de inibir em 50% a agregação plaquetária, na concentração testada, como mostra a figura 10:

Figura 10. Efeito sobre as plaquetas. Teste de inibição da agregação plaquetária feito em triplicata com a BJ-PLA₂-I isolada da serpente de *Bothrops jararaca*, mostrando 50% de inibição da atividade na concentração de 20,5 μ g/mL.

4.7 - Ação da BJ-PLA₂-I sobre o processo inflamatório

4.7.1 - Contagem total e diferencial de leucócitos presentes nos exsudatos inflamatórios de camundongos, após 4 horas de administração da BJ-PLA₂-I em diferentes concentrações.

A figura 11A mostra o resultado da contagem total de leucócitos podendo-se observar que, após o período de 4 horas, houve aumento do número de células em todas as diferentes concentrações administradas. Entretanto, verifica-se aumento significativo nas concentrações de 10 e 20 μ g/mL, se comparadas ao controle negativo (PBS). Em relação ao PBS (550 x 10³/mL), o aumento evidenciado nessas concentrações correspondeu a mais que o dobro, sendo de 1225 x 10³/mL

leucócitos para a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ e de $1575 \times 10^3/\text{mL}$ leucócitos para a de 20 $\mu\text{g/mL}$.

Os leucócitos presentes no exsudato peritoneal, diferenciados em neutrófilos ou em células mononucleares, também foram avaliados. Após a administração das diferentes concentrações citadas no período de 4 horas observou-se aumento significativo para todas as concentrações testadas, se comparadas ao controle negativo (PBS). Os valores encontrados foram de 448, 975 e $1280 \times 10^3/\text{mL}$ de neutrófilos nas respectivas concentrações de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 11B). Para as células mononucleares observou-se uma diminuição, em todas as concentrações testadas, comparadas ao PBS (Fig. 11C).

Figura 11. Contagem total e diferencial de leucócitos presentes na cavidade peritoneal de camundongos após a administração de diferentes concentrações da BJ-PLA₂-I. Após 4 horas da administração de diferentes concentrações da BJ-PLA₂-I (5, 10 e 20 µg/mL) e do controle negativo (PBS), foi feita a contagem do número total **(A)** de leucócitos em câmara de *Neubauer*. Também foi feita a contagem diferencial de neutrófilos **(B)** e células mononucleares **(C)** em microscópio óptico. Os resultados obtidos foram expressos pela média ± SD de três experimentos independentes (n=12) e os valores estatisticamente significantes (p<0,05) foram marcados com * (valores estatisticamente diferentes do controle negativo PBS).

4.7.2 - Contagem total e diferencial de leucócitos presentes nos exsudatos inflamatórios de camundongos, após diferentes tempos de administração da BJ-PLA₂-I na concentração (10 µg/mL).

Primeiro, foi feita a contagem total de leucócitos (Fig.12A) em exsudatos peritoneais de camundongos, após a administração da BJ-PLA₂-I na concentração de 10 µg/mL, coletando-se os lavados peritoneais nos tempos de 2, 4 e 24 horas.

Nos resultados obtidos, observam-se aumento significativo do número de células nos grupos tratados com BJ-PLA₂-I em todos os tempos, apresentando diferença estatística com o controle usado (PBS). Após 2, 4 e 24 horas da administração da amostra observou-se um número de 2130, 1930 e 1630 x 10³/mL leucócitos, respectivamente. Sendo que o maior valor encontrado foi no grupo de 2 horas.

Também foi feita a contagem diferencial dos leucócitos em neutrófilos e células mononucleares, variando-se o tempo na concentração de 10 µg/mL da BJ-PLA₂-I. Neste teste, ocorreu migração significativa de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos apenas nos tempos de 2 e 4 horas, já em 24 horas não se observou aumento no número de neutrófilos, comparando-se com o PBS (Fig. 12B).

Nas células mononucleares o resultado apresentado foi o inverso do encontrado para os neutrófilos. O aumento significativo no número de células (1415,9 x 10³/mL) pode ser verificado após 24 horas de tratamento, comparando com o controle negativo (PBS), entretanto, em 2 e 4 horas, não observou-se alteração significativa, se comparados ao controle (Fig. 12C).

Figura 12. Contagem total e diferencial de leucócitos presentes na cavidade peritoneal de camundongos após a administração da BJ-PLA₂-I em diferentes tempos. Após 2, 4 e 24 horas da administração de 10 $\mu\text{g/mL}$ da BJ- PLA₂-I e do controle negativo (PBS), foi feita a contagem total de leucócitos **(A)** em câmara de *Neubauer*. A contagem diferencial de neutrófilos **(B)** e células mononucleares **(C)** também foi feita em microscópio óptico. Os resultados obtidos foram expressos pela média $\pm$ SD de três experimentos independentes ($n=15$) e os valores estatisticamente significantes ($p<0,05$) foram marcados com * (valores estatisticamente diferentes do controle negativo PBS).

4.7.3 - Determinação de citocinas, óxido nítrico e mediadores lipídicos no lavado peritoneal após administração de BJ-PLA₂-I.

No presente trabalho foi avaliado a liberação das citocinas IL-6, IL-1 β , IL-10 e TNF- α , além do óxido nítrico, proteínas totais e dos mediadores lipídicos LTB₄ e

PGE₂, nos sobrenadantes dos lavados peritoneais coletados nos tempos de 2, 4 e 24 horas, com o tratamento de 10 µg/mL de BJ-PLA₂-I.

Observou-se a produção de IL-6 (128,7 pg/mL) (Fig. 13A) e IL-1β (40,5 pg/mL) (Fig. 13B) em sobrenadantes dos lavados peritoneais coletados em 2 horas após o tratamento do grupo com 10 µg/mL da BJ-PLA₂-I, sendo que os resultados apresentados mostraram diferença estatística do controle negativo (PBS). Entretanto, não foram detectadas as citocinas IL-10 e o TNF-α em nenhum dos grupos tratados. Também foi verificada a presença de proteínas totais (150,5 µg/mL) 2 horas após o tratamento com BJ-PLA₂-I (Fig.14).

Nos experimentos de avaliação da produção de NO, nos lavados peritoneais de camundongos tratados com 10 µg/mL de BJ-PLA₂-I, de acordo com a reação de Griess (item 3.2.6.4) não foi detectado óxido nítrico, nos diferentes tempos testados.

A dosagem dos mediadores lipídicos LTB₄ e PGE₂ também foi feita, observando-se a produção de PGE₂ (410 pg/mL) (Fig.15), entretanto, não foi detectado LTB₄ nos sobrenadantes dos lavados peritoneais coletados nos 3 tempos (2, 4 e 24 horas), com o tratamento de 10 µg/mL de BJ-PLA₂-I.

Figura 13. Dosagem das citocinas IL-6 e IL-1β. As dosagens de IL-6 (A) e IL-1β (B), nos sobrenadantes de lavados peritoneais de camundongos, foram feitas em todos os grupos tratados com 10 µg/mL de BJ-PLA₂-I e do controle negativo (PBS), após 2, 4 e 24 horas da administração da mesma. Apenas no tempo de 2 horas a IL-6 (128,7 pg/mL) e a IL-1β (40,5 pg/mL) foram detectadas. Os resultados foram expressos pela média ± SD de três experimentos independentes (n=15). Os valores estatisticamente significantes (p<0,05) foram marcados com * (valores estatisticamente diferentes do controle negativo PBS).

Figura 14. Dosagem de proteínas totais. A determinação de proteínas totais nos sobrenadantes de lavados peritoneais de camundongos foi feita em todos os grupos tratados com 10 µg/mL de BJ-PLA₂-I e do controle negativo (PBS), após 2, 4 e 24 horas da administração da mesma. Apenas no tempo de 2 horas detectou-se 150,5 µg/mL de proteínas totais. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD de três experimentos independentes (n=15). Os valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram marcados com * (valores estatisticamente diferentes do controle negativo PBS).

Figura 15. Dosagem do mediador lipídico PGE₂. A dosagem de PGE₂ foi determinada utilizando os sobrenadantes dos lavados peritoneais coletados dos grupos tratados com 10 µg/mL de BJ-PLA₂-I, após 2, 4 e 24 horas. Apenas no tempo de 2 horas a PGE₂ foi detectada. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD de três experimentos independentes (n=15). Os valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram marcados com * (valores estatisticamente diferentes do controle negativo PBS).

4.8 - Avaliação da citotoxicidade nas linhagens celulares HL-60, HepG2 e PBMC

A atividade citotóxica da BJ-PLA₂-I, foi avaliada nas linhagens celulares provenientes de pacientes com leucemia promielocítica aguda (HL-60), com carcinoma hepatocelular (HepG2) e do sangue coletado de voluntários saudáveis (PBMC).

No presente trabalho, as linhagens celulares HL-60, HepG2 e PBMC receberam tratamento com a BJ-PLA₂-I em diferentes concentrações, sendo elas: 160, 80, 40, 20, 10, 5 e 2,5 µg/mL. As culturas dessas linhagens não tratadas foram utilizadas como controle negativo (CN), já como controle positivo (CP), foram utilizadas culturas tratadas com 0,33 mg/mL de cisplatina (Darrow®).

Nos resultados encontrados para o PBMC, apenas as concentrações de 160 e 80 µg/mL apresentaram diferença estatística do CN, apresentando 66% e 73% de viabilidade celular, respectivamente. Já as outras concentrações (40 – 2,5 µg/mL) a viabilidade foi em torno de 90% (Fig. 16A).

Para os ensaios com HL-60, todas as concentrações testadas mostraram-se diferentes estatisticamente, se comparadas ao CN. A menor porcentagem de viabilidade celular (65%) apresentada foi na linhagem tratada com 160 µg/mL da BJ-PLA₂-I, nas outras concentrações (80-2,5 µg/mL) a porcentagem de células viáveis está em torno de 79% (Fig. 16B).

Nos ensaios com HepG2, em todas as concentrações testadas (160 – 2,5 µg/mL) não houve diferença estatística do CN. Nas concentrações de 160 a 20 µg/mL, a viabilidade celular foi cerca de 80%, já para as concentrações de 10 a 2,5 µg/mL, em torno de 83% das células estavam viáveis (Fig. 16C).

Para a cisplatina (Darrow®) utilizada como controle positivo também foi feito o teste de viabilidade celular por MTT com o intuito de definir a IC₅₀ relativa, que é a concentração que inibe 50% do crescimento celular. Previamente, as linhagens celulares (PBMC, HL-60 e HepG2) foram tratadas com diferentes concentrações de cisplatina (2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160 e 320 µg/mL). A partir dos resultados obtidos, os dados foram analisados pelo programa *Graph Pad Prism 5* obtendo-se os valores de IC₅₀ relativa para cada uma das linhagens. Para o PBMC o valor da IC₅₀ relativa foi de 13,4 µg/mL, apresentando um intervalo de confiança de 95% entre 8,6 µg/mL e 24,6 µg/mL, para a HL-60 a IC₅₀ relativa foi de 2,791 µg/mL, apresentando um

intervalo de confiança de 95% entre 2,165 e 3,598 $\mu\text{g/mL}$ e, para a HepG2 a IC_{50} relativa foi de 4,146 $\mu\text{g/mL}$, apresentando um intervalo de confiança de 95% entre 2,833 e 6,068 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 16. Teste de Viabilidade celular das linhagens celulares PBMC (A), HL-60 (B) e HepG2 (C) tratadas com BJ-PLA₂-I. Avaliação da citotoxicidade por MTT da BJ-PLA₂-I em linhagens celulares tratadas com diferentes concentrações da enzima (160–2,5 µg/mL) após 24 horas de tratamento. Resultados expressos pela média $\pm$ SD para três experimentos independentes ($n = 3$). As diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram marcadas com * (valores estatisticamente diferentes do PBS. PBS (controle negativo); Cisp (cisplatina, controle positivo). A cisplatina foi utilizada na concentração que inibe 50% do crescimento celular (IC_{50}) determinada previamente para cada linhagem celular. IC_{50} para PBMC: 13,4 µg/mL; para HL-60: 2,791 µg/mL; para HepG2 – 4,146 µg/mL.

DISCUSSÃO

5 - Discussão

A composição das peçonhas de serpentes representa uma mistura complexa e rica em biomoléculas, em geral proteínas, que vêm sendo isoladas e caracterizadas, dentre elas têm-se as serinoproteases, metaloproteases, L-aminoácido oxidases (LAAOs), fosfolipases A₂ (PLA₂s), lectinas tipo-C, desintegrinas e CRISPs (CALVETE, 2007)

Para isolar essas proteínas a partir da peçonha bruta, as técnicas cromatográficas têm sido as mais reportadas, principalmente, as cromatografias de exclusão molecular, de troca iônica, de afinidade e de fase reversa (GUTIÉRREZ, 1997).

Para a purificação da BJ-PLA₂-I da peçonha bruta de *Bothrops jararaca* três passos cromatográficos consecutivos foram necessários, sendo eles: cromatografia de exclusão molecular (coluna Sephacryl S-200), cromatografia de troca iônica (coluna SourceTM 15Q/50 mL) e cromatografia de troca iônica (coluna Mono QTM 5/50 GL).

Serrano e colaboradores (1999) purificaram uma PLA₂ também da peçonha de *Bothrops jararaca*, denominada de BJ-PLA₂, utilizando diferentes passos de isolamento, começando pela técnica de precipitação de proteínas por sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄, seguida de uma cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE Sephacel e finalizando com uma coluna C₃ de fase reversa (SERRANO et al., 1999). Alguns ensaios apresentados mais a frente mostram que a BJ-PLA₂ e a BJ-PLA₂-I podem ser a mesma proteína, mesmo sendo obtidas por diferentes passos cromatográficos.

Na literatura, técnicas semelhantes foram reportadas para o isolamento de PLA₂s de peçonhas botrópicas. A BpPLA₂-TXI, uma PLA₂ isolada da serpente de *Bothrops pauloensis*, foi purificada também utilizando 3 passos cromatográficos, sendo a primeira etapa uma cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl-S300 HR, seguida de uma cromatografia de troca iônica em coluna Hi-Trap Q FF e finalizando com uma cromatografia de fase reversa em coluna C2–C18 (RODRIGUES et al., 2007). A BmooPLA₂, é outro exemplo de PLA₂ isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*, por apenas 2 passos cromatográficos, usando uma coluna de troca catiônica (CM-Sepharose) seguida de coluna de interação hidrofóbica (Phenyl-Sepharose) (SANTOS-FILHO et al., 2008). Outra PLA₂ isolada

da peçonha de serpente do gênero *Bothrops* (*Bothrops erithromelas*), denominada de BE-I-PLA₂ foi purificada pela combinação de três passos cromatográficos, sendo eles: cromatografia de exclusão molecular, de troca catiônica e fase reversa (colunas Superdex 75, Mono Q e C4) (De ALBUQUERQUE et al., 2006). Para o isolamento de PLA₂s presentes em peçonhas de serpentes de outros gêneros, as técnicas cromatográficas também são utilizadas. A Drs-PLA₂ (*Daboia russellii siamensis*) (KHUNSAP et al., 2011), MVL-PLA₂ (*Macrovipera lebetina*) (BAZAA et al., 2010), CC-PLA₂-1 e CC-PLA₂-2 (*Cerastes cerastes*) (KESSENTINI-ZOUARI et al., 2010), crotoxina (*Crotalus durissus terrificus*) (SLOTTA e CONRAT, 1939) e a cardiotoxina (*Naja naja atra*) (RUDRAMMAJI e GOWDA, 1998) são exemplos de PLA₂s isoladas de serpentes de diferentes gêneros a partir de uma associação de passos cromatográficos.

O processo de purificação da BJ-PLA₂-I desenvolvido no presente trabalho, conduziu à sua obtenção com elevado grau de pureza como pode ser observado pela obtenção de uma banda única na eletroforese SDS-PAGE (Fig.4) e no pico homogêneo obtido na cromatografia de fase reversa em C-18 (Fig.4D). O referido processo de purificação apresentou rendimento de 0,2% em relação à peçonha bruta (Tabela 3) tornando-se necessária a repetição do procedimento de purificação por diversas vezes. No entanto, comparativamente a outros estudos realizados, podemos afirmar que este rendimento até abaixo do apresentado na literatura como pode ser constatado pelos estudos desenvolvidos por Higuchi e colaboradores (2007) para o isolamento da bID-PLA₂ da peçonha de *Bothrops leucurus* (HIGUCHI et al., 2007) e por Rodrigues e colaboradores (2007) para a purificação da Bp-PLA₂ da serpente *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES et al., 2007), cujos valores de recuperação encontrados foram de 1,8% e 1,2%, respectivamente.

Sousa e colaboradores (2013) evidenciaram pela técnica proteômica, diferenças em relação à porcentagem dos componentes de diferentes espécies de serpentes do gênero *Bothrops*. Entretanto, apesar da diferença observada, os grupos de toxinas mais comuns (metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A₂ e as lectinas tipo-C) mostraram um padrão semelhante, sendo que, em geral, as metaloproteases representam a maior parte das proteínas encontradas nas peçonhas. Para as serpentes da espécie *Bothrops jararaca* cerca de 40% da peçonha é representada pelas metaloproteases, 24% por lectinas like e apenas 3% por fosfolipases A₂, diferente do que se observa para a peçonha da serpente

Bothrops jararacussu, que apresenta cerca de 20% de fosfolipase A₂ e apenas 20% de metaloproteases compondo a peçonha (SOUSA et al., 2013).

Se comparada a porcentagem de metaloprotease encontrada, há uma pequena quantidade de PLA₂s presentes na peçonha de *Bothrops jararaca*, além disso, fatores como alimentação, sexo, habitat também influenciam na composição da peçonha (ZELANIS et al., 2012). Esses dados podem se relacionar ao baixo rendimento encontrado nos processos de purificação de PLA₂s, como ocorrido com a BJ-PLA₂-I.

As PLA₂s do grupo IIA, possuem em geral de 120 a 135 resíduos de aminoácidos, 7 pontes dissulfeto e massa molecular de 13 a 18 kDa. São moléculas consideradas pequenas e muito estáveis devido às pontes dissulfeto (DENNIS, 1994).

A massa molecular da BJ-PLA₂-I, foi determinada por dois métodos, utilizando a eletroforese SDS-PAGE (Fig.5) e a espectrometria de massas (Fig.6), obtendo-se os seguintes valores: 14,8 kDa e 14,277 kDa, respectivamente. Também foi determinado o pI dessa proteína e o valor encontrado foi de 4,4, o que demonstra que a mesma apresenta características ácidas. É comum encontrar uma diferença de valores entre as técnicas de eletroforese em SDS-PAGE e espectrometria de massas uma vez que esta última é um método mais exato e preciso, apresentando o valor mais próximo do real para a massa da proteína. Entre as PLA₂s descritas, os valores de massas moleculares e pIs, são semelhantes ao encontrado neste trabalho. Os dados apresentados neste trabalho corroboram com os apresentados por Serrano e colaboradores (1999) mostrando que para a BJ-PLA₂ (SERRANO et al., 1999) a massa molecular foi de 14,289 kDa, o que sugere tratar-se da mesma proteína. A BpPLA₂-TXI (RODRIGUES et al., 2007) isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* foi reportada com massa molecular de 13,6 kDa e pI de 4,98, a BmooPLA₂ (SANTOS-FILHO et al., 2008) apresentou características semelhantes com massa de 13,6 kDa e pI 5,2, já para a BI-PLA₂ (Nunes et al., 2011) os valores encontrados de massa molecular e pI foram os seguintes: 15 kDa e 5,4.

Foi feito, neste trabalho, o sequenciamento N-terminal e a digestão trípica da BJ-PLA₂-I e a partir desses dois métodos foi obtido o sequenciamento parcial de 60 resíduos da região N-terminal dessa enzima, incluindo o alinhamento dos digestos trípticos que forneceram os mesmos aminoácidos da sequência N-terminal obtidos por Degradação de Edman. Comparada a outras sequências depositadas no banco

de dados do BLAST-NCBI, a BJ-PLA₂-I mostrou similaridade com PLA₂s de outras serpentes do gênero *Bothrops*, apresentando aminoácidos altamente conservados no alinhamento múltiplo das sequências, como os resíduos de cisteína que estão envolvidos na formação das pontes dissulfeto. Outros resíduos conservados importantes para a atividade catalítica e para o *loop* de ligação ao cálcio, também foram identificados nas sequências dessas PLA₂s.

A BJ-PLA₂-I mostrou 100% de similaridade com a sequência N-terminal da BJ-PLA₂ (SERRANO et al., 1999), uma PLA₂ ácida isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*. Esse dado sugere que a BJ-PLA₂ e a BJ-PLA₂-I possam ser a mesma proteína. Outras informações já apresentadas, como a característica ácida e a massa molecular, foram semelhantes para as duas proteínas, o que reforça ainda mais a hipótese de se tratar da mesma enzima. Entretanto, no presente trabalho, não se obteve o sequenciamento total da BJ-PLA₂-I, inviabilizando a comparação da estrutura completa com a outra proteína (BJ-PLA₂).

O alinhamento múltiplo mostrou que a BJ-PLA₂-I possui identidade de 85%, 75%, 70% e 65% com PLA₂s isoladas das peçonhas de *B.asper* (Basp-PLA₂-II) (FERNANDEZ et al., 2010), *B.leucurus* (BI-PLA₂) (NUNES et al., 2011), *B.pirajai* (Bpir-PLA₂-I) (TEIXEIRA et al., 2011) e *B.moojeni* (BmooPLA₂) (SANTOS-FILHO et al., 2008), respectivamente.

As fosfolipases A₂ são conhecidas por desempenhar diversos efeitos tóxicos e farmacológicos, dentre eles têm-se o miotóxico, neurotóxico, hemolítico edematogênico, citotóxico, hipotensivo, anticoagulante, inibição/ativação da agregação plaquetária, bactericida, pró-inflamatório (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2013). Neste presente trabalho, foi avaliada, principalmente, em relação à caracterização funcional da BJ-PLA₂-I, a atividade fosfolipásica, os efeitos sobre as plaquetas e o potencial inflamatório e antitumoral.

As fosfolipases A₂ encontradas nas peçonhas de serpentes possuem um sítio catalítico altamente conservado formado pelos aminoácidos His48, Asp49, Tyr52 e o Asp99. O ácido aspártico na posição 49 coordena a reação de hidrólise de fosfolipídios juntamente com os resíduos do *loop* de ligação ao íon cálcio (Ca²⁺), sendo esse íon um cofator essencial para a atividade catalítica das PLA₂s. Já foram reportadas PLA₂s que possuem uma mutação na posição 49, a qual troca o resíduo de ácido aspártico por uma lisina, sendo essas fosfolipases denominadas de Lys-49, PLA₂s-Like ou homólogas. Essa substituição de aminoácidos na posição 49 faz com

que as PLA₂s Lys-49 percam em parte ou totalmente a atividade catalítica (OWNBY et al., 1999; WARD et al., 1998).

Foi determinada neste trabalho a atividade fosfolipásica da BJ-PLA₂-I (Fig. 9) isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*, apresentando-se positiva, como o esperado já que a mesma possui o ácido aspártico na posição 49, sendo uma Asp-49. A grande maioria das PLA₂s Asp-49 foram reportadas em relação a essa atividade, que define a característica enzimática dessa molécula.

Santos-Filho (2008), determinou para a BmooPLA₂ isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* a dose fosfolipásica mínima como sendo aquela que produz um halo com cerca de 2 cm. O valor encontrado para essa fosfolipase foi de 1 µg, sendo um pouco menor quando comparada a obtida neste presente trabalho que foi de 2,5 µg (50 µg/mL). A BI-PLA₂ (*Bothrops leucurus*) (NUNES et al., 2011), Bp-PLA₂ (*Bothrops pauloensis*) (RODRIGUES et al., 2007), BpirPLA₂-I (*Bothrops pirajai*) (TEIXEIRA et al., 2011), BmooPLA₂ (*Bothrops moojeni*) (SANTOS-FILHO et al., 2008), BE-I-PLA₂ (*Bothrops erithromelas*) (DE ALBUQUERQUE MODESTO et al., 2006), MTX-I (*Bothrops brazili*) (COSTA et al., 2008), LM-PLA₂-II (*Lachesis muta*) (FULY et al., 2002) e a TJ-PLA₂ (*Trimeresurus jerdonii*) (ZHOU et al., 2004), são exemplos de PLA₂s Asp-49 que possuem significativa atividade catalítica. As PLA₂s GodMT-II (*Bothrops godmani*) (SOUSA et al., 2013), PrTX-I (*Bothrops pirajai*) (DE CASTRO et al., 2000), Bnsp7 (*Bothrops pauloensis*) (SOARES et al., 2000), Mjtx-II (SALVADOR et al., 2013) (*Bothrops moojeni*), BthTx-I (*Bothrops jararacussu*) (GEBRIM et al., 2009) exemplificam as PLA₂s que possuem a lisina na posição 49 e apresentaram baixa ou nenhuma atividade catalítica.

Dentre as toxinas isoladas de peçonhas, algumas classes já foram reportadas em relação aos seus efeitos sobre as plaquetas como as serinoproteases, metaloproteases zinco dependentes, lectinas tipo-C, CRISPs, desintegrinas e fosfolipases A₂ (CALVETE et al., 2007). Um grande número de PLA₂s isoladas de peçonhas de serpentes apresentaram a propriedade de atuar na função plaquetária, sendo elas divididas em 3 grupos. O grupo A inclui as PLA₂s que induzem a agregação plaquetária, o grupo B, aquelas que inibem a agregação plaquetária e o grupo C, é representado por PLA₂s que respondem de maneira bifásica, possuindo atividades pró e antiagregantes (SANTOS-FILHO et al., 2008).

A BJ-PLA₂-I isolada neste trabalho foi avaliada quanto ao seu efeito sobre as plaquetas demonstrando que na concentração de 20,5 µg/mL foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida pelo ADP em 50% (Fig.10).

A PLA₂ denominada de BJ-PLA₂ isolada da peçonha da mesma serpente de interesse neste trabalho (*B. jararaca*), também inibiu na mesma concentração (20,5 µg/mL) a agregação plaquetária induzida por ADP (SERRANO et al., 1999). Esse dado reforça a hipótese de que a BJ-PLA₂-I e a BJ-PLA₂ se tratam da mesma proteína uma vez que o valor da IC₅₀ (20,5 µg/mL) determinada para a BJ-PLA₂ produziu a mesma porcentagem de inibição da agregação para a BJ-PLA₂-I (50%).

Outras PLA₂s isoladas de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* mostraram inibir a agregação plaquetária, corroborando com os dados encontrados neste trabalho. A BpPLA₂-TXI (RODRIGUES et al., 2007) e a BmooPLA₂ (SANTOS-FILHO et al., 2008), obtidas a partir das peçonhas de *Bothrops pauloensis* e *Bothrops moojeni*, inibiram a agregação plaquetária induzida por ADP em cerca de 40% e 50%, respectivamente, na concentração de 160 µg/mL (para a BpPLA₂-TXI) e de 5 µg/mL (para a BmooPLA₂) (RODRIGUES et al., 2007; SANTOS-FILHO et al., 2008). Também as fosfolipases A₂ BpirPLA₂-I (*B. pirajai*) (TEIXEIRA et al., 2011), BthA-I-PLA₂ (*B. jararacussu*) (ROBERTO et al., 2004), BE-I-PLA₂ (*B. erythromelas*) foram reportadas como inibidoras da agregação plaquetária. Entre as fosfolipases A₂, isoladas de outros gêneros de serpentes podem-se citar a LM-PLA₂-II (*Lachesis muta*) (FULY et al., 2002) e a TJ-PLA₂ (ZHOU et al., 2004) (*Trimeresurus jerdonii*) como potentes antiagregantes.

Serrano e colaboradores (1999), no intuito de avaliar a interferência do sítio catalítico na atividade de inibição da agregação plaquetária, testaram a BJ-PLA₂ modificada com inibidor de fosfolipases (p-BPB), capaz de alquilar a histidina conservada na posição 48, abolindo a atividade catalítica da fosfolipase. Os resultados mostram que houve redução na potência de inibição da agregação plaquetária, uma vez que na concentração de 24 µg/mL, a BJ-PLA₂ modificada apresentou 26% de inibição da agregação enquanto que a BJ-PLA₂ inibiu 58% da atividade. Os autores sugerem que, em parte, o sítio catalítico das PLA₂s atua para que ocorra a inibição da agregação, entretanto, eles colocam que mais pesquisas precisam ser feitas para elucidar o mecanismo de ação envolvido nessa atividade (SERRANO et al., 1999).

A inflamação é um processo característico dos envenenamentos por serpentes da família Viperidae e Crotalidae e os efeitos desencadeados pela reação inflamatória não têm sido neutralizados pelos soros antiofídicos comuns (CARNEIRO et al., 2008; MOREIRA et al., 2007; NUNES et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2009).

Os estudos que visam compreender os mecanismos pelos quais as PLA₂s de serpentes promovem o processo inflamatório, comumente utilizam métodos que indicam o aumento da permeabilidade celular como a formação de edema na pele ou na pata e teste *in vitro* que avalia a liberação de histamina pelas células. Outro ensaio relevante é a avaliação da migração leucocitária nos tecidos inflamados, entretanto seu uso tem sido negligenciado e poucos estudos mostram as características do influxo de leucócitos após a administração de PLA₂s (Teixeira et al., 2003). A migração leucocitária é um processo que envolve vários passos que são mediados por uma dinâmica de interação entre moléculas de adesão expressas por leucócitos e células endoteliais, expressão essa regulada por citocinas e quimiocinas (BIEDERMANN et al., 2000).

Neste trabalho, avaliou-se a inflamação pelo ensaio de contagem total de leucócitos e diferencial de células no exsudato peritoneal (Fig.11) após administração da BJ-PLA₂-I isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*. No primeiro experimento, diferentes concentrações (5, 10, 20 µg/ mL) foram administradas a camundongos BALB/c (n=4) e após 4 horas, foi coletado o exsudato peritoneal. Nesta etapa definiu-se a concentração de 10 µg/ mL para o segundo experimento, que tendo a concentração fixa, variou-se o tempo (2, 4 e 24 horas).

Os resultados mostraram, tanto para o primeiro quanto para o segundo experimento, aumento no número total de leucócitos, após a administração da BJ-PLA₂-I, sendo esse aumento não significativo apenas para a concentração de 5 µg/ mL (Fig. 11A). Na contagem diferencial, evidenciou-se aumento significativo de neutrófilos no exsudato retirado da cavidade peritoneal dos camundongos, em todas as concentrações utilizadas no primeiro experimento (Fig. 11B), mas observou-se diminuição do número de células mononucleares, comparando-se com o controle negativo (PBS) (Fig. 11C), em todas as concentrações testadas. Para o segundo experimento, observou-se aumento significativo de neutrófilos nos tempos de 2 e 4 horas (Fig. 12B) e aumento de células mononucleares em 24 horas (Fig. 12C).

Como já citado, há poucos estudos na literatura que relatam a migração celular no processo inflamatório desenvolvido por componentes de peçonha de

serpentes. Em algumas pesquisas, foi reportada a migração celular após a administração de peçonha bruta de serpentes. Neste contexto, Zychar e colaboradores (2010) avaliaram a migração leucocitária em camundongos tratados com peçonha bruta de *Bothrops jararaca* e seus dados se relacionam com os resultados encontrados neste presente estudo, que mostram um aumento do número de leucócitos após o tratamento de camundongos com a PLA₂ isolada de serpentes da mesma espécie (ZYCHAR et al., 2010). Eles demonstram que, após 4 horas da administração da peçonha bruta de *Bothrops jararaca*, houve um aumento no influxo de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos. Além disso, eles sugerem, a partir da incubação da peçonha bruta com um inibidor de fosfolipases A₂ (brometo de *p*-bromofenacila : *p*-BPB), que a atividade catalítica das PLA₂s não está relacionada com a migração leucocitária observada. Isso porque, após a administração em camundongos de peçonha bruta e inibidor, verificou-se um aumento no número de leucócitos na cavidade peritoneal dos camundongos, resultado semelhante ao observado na administração apenas de peçonha bruta (ZYCHAR et al., 2010). Também Gutierrez e colaboradores (1986) avaliaram a migração de leucócitos em seu estudo. Eles mostraram que houve um aumento pouco significativo de leucócitos após 6 horas de administração da peçonha bruta de *Bothrops asper* (*B.asper*) no músculo gastrocnêmico de camundongos, mas após 24, 48 e 72 horas de tratamento, observou-se aumento do número dessas células (GUTIÉRREZ et al., 1986). Ainda avaliando o influxo de leucócitos, Moreira e colaboradores (2012) evidenciaram uma infiltração dessas células na cavidade peritoneal de camundongos após a administração da peçonha bruta de *B. atrox*, entre os períodos de 1 a 8 horas (MOREIRA et al., 2012).

Dentre as PLA₂ isoladas de peçonhas de serpentes, algumas foram reportadas quanto a capacidade de induzir um influxo de leucócitos. A bothropstoxina-I (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988), piratoxina-I (DE CASTRO et al., 2000) e bothropstoxina-II (WARD et al., 1995), após serem administradas na cavidade pleural de ratos, foram capazes de recrutar neutrófilos para conter a inflamação. Após 6 horas a administração da bothropstoxina-I, uma PLA₂ Asp-49 isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu* (*B.jararacussu*), observou-se um aumento no número total de leucócitos na cavidade pleural, sendo representado principalmente por neutrófilos, com uma participação pequena das células mononucleares (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988). A bothropstoxina-II é uma

PLA₂ Lys-49 que também foi isolada da peçonha bruta de *B.jararacussu*. Ela induziu um aumento do número de leucócitos na cavidade peritoneal após 6 e 12 horas de tratamento dos ratos, sendo representados, principalmente, por neutrófilos e alguns polimorfonucleares (WARD et al., 1995). A piratoxina-I, também uma PLA₂ Lys-49, isolada da peçonha de *Bothrops pirajai*, foi capaz de produzir um aumento significativo no número de leucócitos na cavidade peritoneal de ratos após 12 horas de tratamento, diferenciados em células mononucleares, principalmente, com um pequeno, mais significativo número de neutrófilos (DE CASTRO et al., 2000).

Outros estudos corroboram com os resultados encontrados neste presente trabalho. Zuliani e colaboradores (2010) evidenciaram a migração leucocitária após 6 e 24 horas de aplicação de duas PLA₂s isoladas da peçonha de *Bothrops asper*, serpente do mesmo gênero da *Bothrops jararaca* de interesse deste trabalho. Denominadas de MT-II (Lys49) e MT-III (Asp49), as duas PLA₂s foram capazes de induzir um influxo leucocitário em camundongos, após 6 e 24 horas de tratamento. Na contagem diferencial, encontrou-se um número significativo de neutrófilos se comparados às células mononucleares que, não apresentaram diferença estatística do controle negativo (ZULIANI et al., 2005).

Nos estudos apresentados, as PLA₂s Asp-49 (bothropstoxina-I e MT-III) mostram um potencial mais evidente para desencadear o processo inflamatório, promovendo um influxo maior de leucócitos do que as PLA₂ Lys-49 (bothropstoxina-II, piratoxina-I e MT-II) apresentadas. Os mesmos estudos mostram que a atividade catalítica não está relacionada com a produção da reação inflamatória, já que após a administração das PLA₂s com um inibidor da atividade catalítica não houve alteração dos resultados (DE CASTRO et al., 2000; ZULIANI et al., 2005). Neste contexto, para compreender melhor o mecanismo pelo qual as PLA₂s desencadeiam a inflamação, outros ensaios podem ser feitos.

Neste trabalho, verificamos a participação de algumas citocinas (IL-6, IL-1 β , IL-10, TNF- α), mediadores lipídicos (PGE₂ e LTB₄), proteínas totais e óxido nítrico no processo inflamatório. Os resultados encontrados mostram a liberação de IL-6, IL-1 β (Fig. 13), PGE₂ (Fig. 15) e proteínas totais (Fig. 14) na inflamação, entretanto, não foram detectados IL-10, TNF- α e óxido nítrico.

As citocinas são pequenas moléculas responsáveis pela comunicação entre as células e regulam todas as fases da resposta inflamatória (AREND e GABAY, 2004). Leucócitos ativados liberam um amplo espectro de citocinas, tais como IL-1 β

e IL-6, além de proteínas que contribuem no processo inflamatório. As citocinas IL-6, IL-10, IL-1 β , TNF- α são as principais reguladoras da resposta inflamatória, sendo capazes de induzir febre, expressão de moléculas de adesão e a ativação das células T e B (KIDA et al., 2005).

TNF- α induz a síntese de substâncias que causam danos teciduais, como o óxido nítrico (DINARELLO, 1996). Neste sentido, os dados deste trabalho se relacionam uma vez que, não sendo detectado TNF- α , a produção de óxido nítrico pode também ficar comprometida.

Zamuner e colaboradores (2005) mostram dados semelhantes aos encontrados neste trabalho. Após a administração de peçonha bruta da serpente *Bothrops asper*, observou-se a produção da citocina IL-6 no processo inflamatório (Zamuner et al., 2005). Nunes e colaboradores (2011) também evidenciaram a participação da IL-6 na inflamação induzida após a administração da BI-PLA₂, uma PLA₂ ácida isolada da peçonha de *Bothrops leucurus* (NUNES et al., 2011). Essa citocina, produzida por linfócitos e macrófagos, possui propriedades pró-inflamatórias, ativando e estimulando a maturação de neutrófilos, além de contribuir para o influxo de leucócitos para áreas inflamadas. Além disso, ela atua na imunidade inata, estimulando a síntese de proteínas da fase aguda durante o processo inflamatório (HOPKINS, 2003). Assim, a liberação de IL-6 está relacionada com a presença de proteínas verificadas no processo inflamatório induzido pela administração da BJ-PLA₂-I, uma vez que, essa citocina estimula a síntese proteica. A síntese de proteínas, verificada neste trabalho, também foi evidenciada por Zoccal e colaboradores, após a administração de toxinas presentes na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*. Os autores associam a síntese de proteínas à formação de edema, entretanto, de maneira geral, as proteínas contribuem no processo pró-inflamatório (ZOCCAL et al., 2013).

Neste trabalho, também foi evidenciado a liberação da citocina IL-1 β , 2 horas após a administração da BJ-PLA₂-I, citocina produzida principalmente por fagócitos mononucleares (macrófagos e monócitos). A IL-1 é encontrada em 2 formas moleculares a IL-1 β e a IL-1 α que apresentam baixa homologia entre si (menos de 30%) mas, elas se ligam ao mesmo receptor e desencadeiam respostas biológicas semelhantes. A IL-1 β atua na ativação de linfócitos, estimulação de macrófagos e adesão de leucócitos e células endoteliais. Além disso, ela regula a síntese de prostaglandinas e citocinas, como a IL-6 e IL-8. Pode-se associar a presença de IL-

1 β , detectada após 2 horas de administração da BJ-PLA₂-I, com a liberação de IL-6 na reação inflamatória induzida pela mesma proteína, já que a IL-1 β regula a síntese de IL-6. Rucavado e colaboradores (2002) verificaram a liberação da IL-1 β e IL-6 no músculo gastrocnêmico de ratos após indução com a MT-III uma PLA₂ isolada da peçonha de *Bothrops asper* (RUCAVADO et al., 2002). Neste trabalho não foi detectado a presença da IL-10, citocina anti-inflamatória que atua inibindo macrófagos ativados. Esse dado também foi verificado no processo inflamatório induzido pela BI-PLA₂ (NUNES et al., 2011).

O LTB₄ é um mediador lipídico com capacidade de induzir a migração de leucócitos para áreas inflamadas, além de influenciar na agregação e adesão celular (ZULIANI et al., 2005). Não foi detectada a presença de LTB₄ no sobrenadante de exsudatos inflamatórios após tratamento com a BJ-PLA₂-I isolada neste trabalho. Esses dados diferem de outros encontrados na literatura, em que se observa a influência desse eicosanoide na indução da inflamação. A piratoxina-I, bothropstoxina-II e a MT-III, fosfolipases A₂ isoladas de peçonhas de serpentes induziram a liberação de LTB₄ na reação inflamatória. A não correlação entre os resultados pode ser devido a diferenças na dose, no local da administração e no tipo de animal a qual as PLA₂s foram administradas (DE CASTRO et al., 2000; ZAMUNER et al., 2005; ZULIANI et al., 2005). Em seu trabalho, Carneiro e colaboradores (2008) evidenciaram diferentes perfis de migração leucocitária nas seguintes amostras: medula óssea, sangue periférico e exsudato local de ratos administrados com peçonha bruta de *B. jararaca*. Não foi observado influxo de leucócitos na medula óssea, entretanto verificou-se um aumento no número dessas células no sangue periférico e no exsudato local, com predominância de neutrófilos (CARNEIRO et al., 2008).

Eventos inflamatórios induzidos pela peçonha da serpente *B. jararaca* têm sido atribuídos à liberação de mediadores, incluindo as interleucinas, eicosanoides (prostaglandinas-PGs), tromboxanos e leucotrienos (FARSKY et al., 1997; ZAMUNER et al., 2005). As prostaglandinas E₂ são membros importantes da família das prostaglandinas e desempenham várias funções na inflamação, exercendo efeitos imunomodulatórios, atuando como potente vasodilatador e indutor de bradicininas. A PGE₂ também é conhecida por suprimir a produção da citocina TNF- α , além de inibir a proliferação de células T (KNUDSEN et al., 1986; NATARAJ et al., 2001). A biossíntese de PGs é iniciada pela enzima endoperóxido-sintetase ou ciclo-

oxigenase (COX), que atua convertendo ácido araquidônico em um intermediário instável (PGG₂), outra enzima, a endoperóxido-sintetase converte a PGG₂ em PGE₂ (SMITH et al., 2000). Moreira e colaboradores (2007) avaliaram em seu estudo a liberação de PGE₂ e a sua relação com a expressão de COX-1 e COX-2 em lavados peritoneais de camundongos, após 30 min, 1, 3, 6 e 12 horas de tratamento com peçonha bruta de *B.jararaca*. Eles evidenciaram a presença de PGE₂ em seus resultados, após 3 a 12 horas de tratamento, com um pico em 3 horas (MOREIRA et al., 2007). Corroborando com estes resultados, Teixeira e colaboradores (2009) observaram a liberação de PGE₂ em inflamação induzida após a administração da peçonha bruta de *B.asper*, esses dados também se relacionam com os resultados encontrados neste presente trabalho que verificou a presença de PGE₂ em sobrenadantes de lavados peritoneais coletados de camundongos após 2 horas de tratamento (TEIXEIRA et al., 2009).

Os estudos com as peçonhas brutas de *B.jararaca* e *B.asper* mostraram que juntamente com a liberação da PGE₂ observou-se a expressão de COX-2, indicando que a inflamação desencadeada está relacionada com a síntese de eicosanoides, pelo metabolismo do ácido araquidônico. Extrapolando esses dados para os resultados encontrados neste trabalho, pode-se sugerir que a inflamação observada está relacionada com a atividade da BJ-PLA₂ em degradar a cadeia fosfolipídica, formando ácido araquidônico que é precursor de eicosanoides e que pode atuar por duas vias, a da ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2) e a da lipo-oxigenase (LOXs). A presença de PGE₂ indica que a inflamação induzida após a administração de BJ-PLA₂-I foi gerada pela via das ciclo-oxigenase, necessitando de mais estudos para definir se ocorre por via COX-1 ou COX-2. Outra observação que comprova isso, é que não foi detectada a presença de LTB₄, um leucotrieno formado a partir da via das LOXs. Além disso, as citocinas também desempenharam papel importante na reação inflamatória, indicando que a IL-6 detectada, possa ter tido sua liberação estimulada pela IL-1 β , outra citocina encontrada. Elas podem ter influenciado na migração de leucócitos para a área inflamada. A não detecção de TNF- α também corrobora com esses dados, uma vez que a PGE₂ inibe a produção dessa citocina, inclusive a não detecção de óxido nítrico também se relaciona com esses dados, uma vez que a TNF- α induz a produção desse gás. Outro ponto observado é que não houve a liberação de citocina anti-inflamatória, o que mostra a potência pró-inflamatória da inflamação induzida pela BJ-PLA₂-I.

As peçonhas de serpentes representam uma mistura complexa de componentes com potencial biotecnológico para o tratamento de diversas doenças como, a inflamação, a trombose e o câncer. A capacidade que as peçonhas possuem em causar alterações celulares é conhecida há anos, sendo o primeiro estudo reportado em 1976 por DeWys e colaboradores que avaliaram o espalhamento de células tumorais após o tratamento com polipeptídio extraído da peçonha de *Caloselasma rhodostoma* (DEWYS et al., 1976).

As fosfolipases A_2 isoladas de peçonhas de serpentes atuam diretamente sobre o metabolismo de membranas fosfolipídicas e características como alteração da biossíntese lipídica e desregulação da lipogênese têm sido identificadas em células tumorais. Nesse contexto, as PLA_2 s vêm sendo estudadas como ferramentas para entender melhor os mecanismos que estão envolvidos no câncer e como possíveis modelos moleculares de novos fármacos para o tratamento de tumores (MASHIMA et al., 2009).

Neste trabalho, o potencial antitumoral da BJ- PLA_2 -I ácida isolada da peçonha de *B. jararaca* foi avaliado utilizando diferentes concentrações dessa enzima (160-2,5 $\mu\text{g/mL}$) nas linhagens tumorais HL-60 e HepG2 e em linfócitos humanos de sangue periférico (PBMC), utilizando o método do MTT. Os resultados mostram que para o PBMC, apenas as concentrações de 160 e 80 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram diferença estatística do CN, observando 66% e 73% de viabilidade celular, respectivamente. Já as outras concentrações (40-2,5 $\mu\text{g/mL}$) a viabilidade foi em torno de 90% (Fig. 17A). Para os ensaios com HL-60, todas as concentrações testadas mostraram-se diferentes estatisticamente, se comparadas ao CN. A menor porcentagem de viabilidade celular (65%) apresentada foi na linhagem tratada com 160 $\mu\text{g/mL}$ da PLA_2 isolada, nas outras concentrações (80-2,5 $\mu\text{g/mL}$) a porcentagem de células viáveis está em torno de 79% (Fig. 17B). Nos ensaios com HepG2, em todas as concentrações testadas (160 – 2,5 $\mu\text{g/mL}$) não houve diferença estatística do CN. Nas concentrações de 160 a 20 $\mu\text{g/mL}$, a viabilidade celular foi cerca de 80%, já para as concentrações de 10 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$, em torno de 83% das células que estavam viáveis (Fig. 17C). A partir dos resultados pode-se verificar que a BJ- PLA_2 -I possui um pequeno potencial antitumoral na linhagem HL-60, já que na maior concentração utilizada (160 $\mu\text{g/mL}$) a porcentagem de células tumorais viáveis (65%) é idêntica à encontrada para as células normais viáveis (PBMC) (66%). Para a HepG2, os resultados mostram que a BJ- PLA_2 -I não produziu alterações na

viabilidade de células, uma vez que, se compara ao CN, ela não apresenta diferença estatística.

Há vários trabalhos envolvendo a avaliação da viabilidade celular com PLA₂s básicas, entretanto, são poucas as PLA₂s ácidas descritas quanto a sua atividade citotóxica.

Modesto e colaboradores (2009) avaliaram em seu trabalho o potencial citotóxico da BE-I-PLA₂, uma PLA₂ ácida isolada da peçonha de *Bothrops erithromelas*, em células de veias umbilicais humanas (HUVEC), a qual não se mostrou tóxica a essas células humanas normais. Pode-se relacionar o resultado encontrado neste presente trabalho com o descrito por Modesto e colaboradores considerando que, para o PBMC a porcentagem de morte das células foi muito pequena (MODESTO et al., 2006). Outro resultado semelhante ao do presente trabalho foi o encontrado por Nunes e colaboradores, que verificaram que a BI-PLA₂, uma PLA₂ ácida isolada da serpente de *Bothrops leucurus* apresentou baixa citotoxicidade em células de leucócitos humanos de sangue periférico (PBMC) (NUNES et al., 2011).

Outras PLA₂s extraídas de peçonhas do gênero *Bothrops* foram descritas em relação a habilidade citotóxica. Roberto e colaboradores (2004) avaliaram o potencial antitumoral da PLA₂ ácida denominada de BthA-I-PLA₂, em 3 linhagens tumorais, Jurkat (células leucêmicas), SK-BR-3 (células tumorais de mama humano) e EAT (células tumorais ascíticas de Erlich). Eles verificaram que, na concentração de 100 µg/mL, sobre as linhagens celulares Jurkat e SK-BR-3, a BthA-I-PLA₂ possui um bom potencial antitumoral, matando 50% e 70% das células tumorais, respectivamente. Entretanto, para a linhagem EAT observou-se que 80% das células tumorais estavam viáveis, dado que se relaciona ao encontrado neste trabalho em relação à linhagem tumoral HL-60, que após tratamento com a BJ-PLA₂-I obteve-se 65% de viabilidade celular, o que mostra que tanto a BthA-I-PLA₂ quanto a BJ-PLA₂-I possuem um pequeno potencial antitumoral sobre essas células (ROBERTO et al., 2004). Também as PLA₂s ácidas, BmooTX-I (SANTOS-FILHO et al., 2008) e MTX-I (COSTA et al., 2008), isoladas das serpentes *Bothrops moojeni* e *Bothrops brazili* foram testadas em Jurkat, apresentando em torno de 50% e 40% de viabilidade celular, na concentração de 100 µg/mL, mostrando-se mais potentes como agentes antitumorais do que a BJ-PLA₂-I.

Fosfolipases A₂ isoladas de serpentes de outros gêneros também foram descritas em relação à atividade antitumoral. A nigexina, uma PLA₂ purificada a partir da peçonha de *Naja nigricollis* foi caracterizada como citotóxica para as linhagens celulares C-13T (neuroblastoma) e HL-60 (leucemia promielocítica), observando-se uma alteração maior na viabilidade celular na linhagem em suspensão (HL-60) (CHWETZOFF et al., 1989). Nos resultados encontrados para a HL-60 neste trabalho, também foi observado que a linhagem em suspensão é mais sensível a atividade da PLA₂ (BJ-PLA₂-I) do que a linhagem aderente (HepG2).

A NN-XIa-PLA₂ (KHUNSAP et al., 2011) PLA₂ isolada da peçonha de *Naja naja naja*, também mostrou atividade citotóxica em células tumorais de Erlich e a Drs-PLA₂, PLA₂ isolada da peçonha de *Daboia russelii siamensis*, (BASAVARAJAPPA e GOWDA, 1992) apresentou citotoxicidade frente as células tumorais de melanoma de pele humano (SK-MEL-28).

Gebrim e colaboradores avaliaram a relação entre a atividade catalítica das fosfolipases A₂ e a atividade tumoral. Eles trataram células da linhagem Jurkat com a PLA₂ BthTX-I modificada com um inibidor de atividade catalítica (BPB), sendo então denominada de BPB-BthTX-I, tendo essa enzima alta atividade antitumoral. No experimento, eles verificaram que, mesmo com perda da atividade catalítica, a enzima ainda mostrou alto potencial, matando 70% das células tumorais (GEBRIM et al., 2009).

A atividade antitumoral pode ser apresentada por algumas fosfolipases A₂ como exemplificado, entretanto, a maior parte dessas enzimas não exibe essa atividade, o que leva os pesquisadores a sugerir que outros mecanismos estejam envolvidos na citotoxicidade, não relacionados à atividade catalítica (CHWETZOFF et al., 1989; GEBRIM et al., 2009).

Outros componentes isolados de peçonhas de serpentes já foram descritos como potentes agentes citotóxicos, como por exemplo, as L-aminoácido oxidases (LAAO) (COSTA et al., 2014), desintegrinas e lectinas tipo-C (LOMONTE et al., 2003).

Apoxin-I (TORII et al., 1997), ACTX-6 (ZHANG e WU, 2008), BmooLAAO-I (STABELI et al., 2005), BI-LAAO (NUNES et al., 2011) são exemplos de LAAOs purificadas da peçonha das seguintes serpentes: *Crotalus atrox*, *Agkistrodon acutus*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops leucurus* descritas pelo alto potencial antitumoral sobre diferentes linhagens celulares. Dentre as desintegrinas com atividade tumoral

relevante, podem-se citar a contortrostatina isolada da peçonha de *Agkistrodon contortrix contortrix* (CHEN et al., 2006), a leucurogina purificada da peçonha de *Bothrops leucurus* e a echistatina proveniente da peçonha de *Echis carinatus* (STAIANO et al., 1995). Já entre a lectinas tipo-C com alto potencial antitumoral têm-se a BJcuL (DE CARVALHO et al., 2001) isolada da peçonha de *B. jararacussu* e a lebectina e lebecetina provenientes da peçonha de *Macrovipera lebetina* (De CARVALHO et al., 2001; SARRAY et al., 2007).

As informações obtidas no presente trabalho trazem contribuições expressivas para os estudos das toxinas animais tanto no que se refere ao envenenamento por peçonhas botrópicas quanto a compreensão dos mecanismos envolvidos nas atividades biológicas desempenhadas pelas PLA₂s . A BJ-PLA₂-I pode contribuir para o campo biotecnológico, servindo como modelo molecular para a formulação de fármacos mais eficazes utilizados nos tratamentos de várias doenças.

CONCLUSÕES

6 - Conclusões

Com base nos resultados conclui-se que:

- Foi padronizada uma metodologia prática e eficiente para a purificação da BJ-PLA₂-I a partir da peçonha de *Bothrops jararaca*, que consistiu de três etapas cromatográficas: cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-200), cromatografia de troca iônica (Source 15 Q) e cromatografia de troca iônica (Mono-Q) com um rendimento de 0,2%.

- Do referido método foi isolada uma fosfolipase A₂ denominada de BJ-PLA₂-I, em elevado estado de pureza e que apresentou as seguintes características bioquímicas: massa molecular de 14,8 kDa (SDS-PAGE) e 14,2 kDa (espectrometria de massas) e pI 4,4, ou seja, uma fosfolipase ácida.

- O sequenciamento dos primeiros 60 resíduos da posição N-terminal permitiram avaliar a similaridade da BJ-PLA₂-I com outras proteínas depositadas no banco de dados do BLAST-NCBI. Ela apresentou identidades com outras PLA₂s isoladas de peçonhas de serpentes botrópicas, inclusive mostrou 100% de identidade com a BJ-PLA₂, PLA₂ isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*. Caracterizou-se como uma PLA₂ Asp-49, apresentando na posição 49 o resíduo de ácido aspártico.

- Os ensaios de atividade funcional mostraram que a BJ-PLA₂-I possui propriedades catalíticas, antiagregantes na agregação plaquetária, indutora de inflamação aguda local e baixo potencial antitumoral. No teste de agregação plaquetária, a BJ-PLA₂-I na concentração de 20,5 µg/mL, inibiu 50% da agregação induzida por ADP. Caracterizou-se como pró-inflamatória, promovendo influxo de leucócitos, principalmente, neutrófilos no local da inflamação, além de liberar as citocinas IL-1β, IL-6, proteínas totais e a PGE₂ durante o processo inflamatório.

- Mostrou-se com baixo potencial antitumoral, sendo que na linhagem HL-60 as maiores concentrações testadas mataram em torno de 20% das células tumorais. Para as linhagens PBMC e HepG2, a BJ-PLA₂-I não induziu alterações significativas na viabilidade dessas células.

A hipótese de que a BJ-PLA₂-I isolada neste trabalho seja a mesma proteína isolada por Serrano e colaboradores (1999) foi levantada e algumas semelhanças, como a massa molecular, a característica ácida, o ácido aspártico na posição 49, a identidade de 100% entre as sequências parciais, atividade catalítica e inibidora da

agregação plaquetária, contribuem para que essa hipótese seja verdadeira. Entretanto, não se obteve a sequência completa da BJ-PLA₂-I e não se pode afirmar com certeza se ela é a mesma PLA₂ isolada por Serrano e colaboradores.

Concluindo, as informações adquiridas neste trabalho são de suma importância para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas atividades biológicas desempenhadas pelas PLA₂s. Além disso, a BJ-PLA₂-I pode servir como modelo molecular para a formulação de fármacos mais eficazes utilizados nos tratamentos de várias doenças, como a inflamação, a trombose e o câncer. O estudo também contribui para o melhor entendimento do envenenamento por peçonhas botrópicas, o que auxilia na formulação de soros antiofídicos específicos.

REFERÊNCIAS

7- Referências

ARAYA, C.; LOMONTE, B. Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A2 homologues of snake venoms. **Cell Biol Int**, 31(3): 263-268, 2007.

AREND, W. P.; GABAY, C. Cytokines in the rheumatic diseases. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, 30(1): 41-67, 2004.

BARRAVIERA, B. Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro, **EPUB**, cap.70 pag. 150-180, 1994.

BASAVARAJAPPA, B. S.; GOWDA, T. V. Comparative characterization of two toxic phospholipases A2 from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. **Toxicon**, 30(10): 1227-1238, 1992.

BAZAA, A.; PASQUIER, E.; DEFILLES, C.; LIMAM, I.; KESSENTINI-ZOUARI, R.; KALLECH-ZIRI, O.; EL BATTARI, A.; BRAGUER, D.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N.; LUIS, J. MVL-PLA2, a snake venom phospholipase A2, inhibits angiogenesis through an increase in microtubule dynamics and disorganization of focal adhesions. **PLoS One**, 5(4): e10124, 2010.

BIEDERMANN, T.; KNEILLING, M.; MAILHAMMER, R.; MAIER, K.; SANDER, C. A.; KOLLIAS, G.; KUNKEL, S. L.; HULTNER, L.; ROCKEN, M. Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. **J Exp Med**, 192(10): 1441-1452, 2000.

BLOM, M. A.; VAN TWILLERT, M. G.; DE VRIES, S. C.; ENGELS, F.; FINCH, C. E.; VEERHUIS, R.; EIKELENBOOM, P. NSAIDS inhibit the IL-1 beta-induced IL-6 release from human post-mortem astrocytes: the involvement of prostaglandin E2. **Brain Res**, 777(1-2): 210-218, 1997.

BORN, G.V.R.; CROSS, M.J. The aggregation of blood platelets. **J Physiol**, (168) 178-195, 1962.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). **Journal of Thermal Biology**, 31(1–2): 208-219, 2006.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **J Lipid Res**, 50 Suppl: S237-242, 2009.

CALDERON, L. A.; SOBRINHO, J. C.; ZAQUEO, K. D.; DE MOURA, A. A.; GRABNER, A. N.; MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; NOMIZO, A.; FERNANDES, C. F.; ZULIANI, J. P.; CARVALHO, B. M.; DA SILVA, S. L.; STABELI, R. G.; SOARES, A. M. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. **Biomed Res Int**, 2014: 203639, 2014.

CALVETE, J. J.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, 42(11): 1405-1414, 2007.

CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; VORRARO, F.; DE FRANCO, M.; IBANEZ, O. M.; STAROBINAS, N. Bothrops jararaca venom (BjV) induces differential leukocyte accumulation in mice genetically selected for acute inflammatory reaction: the role of host genetic background on expression of adhesion molecules and release of endogenous mediators. **Toxicon**, 52(5): 619-627, 2008.

CARRASCO, P. A.; MATTONI, C. I.; LEYNAUD, G. C.; SCROCCHI, G. J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, 41(2): 109-124, 2012.

CHAIM-MATYAS, A.; OVADIA, M. Cytotoxic activity of various snake venoms on melanoma, B16F10 and chondrosarcoma. **Life sciences**, 40(16): 1601-1607, 1987.

CHEN, B. C.; LIAO, C. C.; HSU, M. J.; LIAO, Y. T.; LIN, C. C.; SHEU, J. R.; LIN, C. H. Peptidoglycan-induced IL-6 production in RAW 264.7 macrophages is mediated by cyclooxygenase-2, PGE₂/PGE₄ receptors, protein kinase A, I kappa B kinase, and NF-kappa B. **J Immunol**, 177(1): 681-693, 2006.

CHWETZOFF, S.; TSUNASAWA, S.; SAKIYAMA, F.; MENEZ, A. Nigexine, a phospholipase A₂ from cobra venom with cytotoxic properties not related to esterase activity. Purification, amino acid sequence, and biological properties. **J Biol Chem**, 264(22): 13289-13297, 1989.

COSTA, L. A.; MILES, H.; ARAUJO, C. E.; GONZALEZ, S.; VILLARRUBIA, V. G. Tumor regression of advanced carcinomas following intra- and/or peri-tumoral inoculation with VRCTC-310 in humans: preliminary report of two cases. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 20(1): 15-25, 1998.

COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; OLIVEIRA, C. Z.; SANTOS-FILHO, N. A.; TEIXEIRA, S. S.; NOMIZO, A.; FULY, A. L.; MONTEIRO, M. C.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; STÁBELI, R. G.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, 29(10): 1645-1656, 2008.

CUMMINGS, B. S. Phospholipase A₂ as targets for anti-cancer drugs. **Biochemical Pharmacology**, 74(7): 949-959, 2007.

DE ALBUQUERQUE MODESTO, J. C.; SPENCER, P. J.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R. C.; OLIVA, M. L. V.; DA SILVA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; GUARNIERI, M. C. BE-I-PLA₂, a novel acidic phospholipase A₂ from *Bothrops erythromelas* venom: Isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I₂ release by endothelial cells. **Biochemical Pharmacology**, 72(3): 377-384, 2006.

- DE CARVALHO, D. D.; SCHMITMEIER, S.; NOVELLO, J. C.; MARKLAND, F. S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon**, 39(10): 1471-1476, 2001.
- DE CASTRO, R. C.; LANDUCCI, E. C.; TOYAMA, M. H.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A₂ into the rat pleural cavity. **Toxicon**, 38(12): 1773-1785, 2000.
- DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J Biol Chem**, 269(18): 13057-13060, 1994.
- DEWYS, W. D.; KWAAN, H. C.; BATHINA, S. Effect of defibrination on tumor growth and response to chemotherapy. **Cancer Res**, 36(10): 3584-3587, 1976.
- DINARELLO, C. A. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock, **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Vol. 216: 133-165, 1996.
- DU, X.-Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom l-amino acid oxidases. **Toxicon**, 40(6): 659-665, 2002.
- FARSKY, S. H.; WALBER, J.; COSTA-CRUZ, M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. **Toxicon**, 35(2): 185-193, 1997.
- FERNANDEZ, J.; GUTIERREZ, J. M.; ANGULO, Y.; SANZ, L.; JUAREZ, P.; CALVETE, J. J.; LOMONTE, B. Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: biochemical and toxicological characterization. **Biochimie**, 92(3): 273-283, 2010.

FERNANDEZ, J. H.; SILVA, C. A.; ASSAKURA, M. T.; CAMARGO, A. C.; SERRANO, S. M. Molecular cloning, functional expression, and molecular modeling of bothrostatin, a new highly active disintegrin from Bothrops jararaca venom. **Biochem Biophys Res Commun**, 329(2): 457-464, 2005.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. **Curr Pharm Des**, 13(28): 2927-2934, 2007.

FOX, J. W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: l-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. **Toxicon**, 62(0): 75-82, 2013.

FULY, A. L.; DE MIRANDA, A. L.; ZINGALI, R. B.; GUIMARAES, J. A. Purification and characterization of a phospholipase A2 isoenzyme isolated from Lachesis muta snake venom. **Biochem Pharmacol**, 63(9): 1589-1597, 2002.

FURTADO, J. L.; OLIVEIRA, G. A.; PONTES, A. S.; SETUBAL SDA, S.; XAVIER, C. V.; LACOUTH-SILVA, F.; LIMA, B. F.; ZAQUEO, K. D.; KAYANO, A. M.; CALDERON, L. A.; STABELI, R. G.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J. P. Activation of J77A.1 macrophages by three phospholipases A2 isolated from Bothrops atrox snake venom. **Biomed Res Int**, 2014: 683123, 2014.

GALAN, J. A.; SANCHEZ, E. E.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A.; SOTO, J. G.; BASHIR, S.; MCLANE, M. A.; PAQUETTE-STRAUB, C.; PEREZ, J. C. Inhibition of lung tumor colonization and cell migration with the disintegrin crotatroxin 2 isolated from the venom of Crotalus atrox. **Toxicon**, 51(7): 1186-1196, 2008.

GEBRIM, L. C.; MARCUSSI, S.; MENALDO, D. L.; DE MENEZES, C. S.; NOMIZO, A.; HAMAGUCHI, A.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Antitumor effects of snake

venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. **Biologicals**, 37(4): 222-229, 2009.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; CERDAS, L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with Bothrops asper venom. **Revista de biologia tropical**, 34(2): 209-214, 1986.

HENRIQUES, O. B.; FICHMAN, M.; BERALDO, W. T. Bradykinin-releasing Factor from Bothrops jararaca venom. **Nature**, 187(4735): 414-415, 1960.

HIGUCHI, D. A.; BARBOSA, C. M. V.; BINCOLETTTO, C.; CHAGAS, J. R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. L. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from Bothrops leucurus (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, 89(3): 319-328, 2007.

HO, I. C.; ARM, J. P.; BINGHAM, C. O.; 3RD, CHOI, A.; AUSTEN, K. F.; GLIMCHER, L. H. A novel group of phospholipase A2s preferentially expressed in type 2 helper T cells. **J Biol Chem**, 276(21): 18321-18326, 2001.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of Bothrops jararacussu snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, 26(7): 615-627, 1988.

HOPKINS, S. J. The pathophysiological role of cytokines. **Legal Medicine**, 5(SUPPL. 1): S45-S57, 2003.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; DE SILVA, H. J. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **PLoS Med**, 5(11): e218, 2008.

KESSENTINI-ZOUARI, R.; JEBALI, J.; TABOUBI, S.; SRAIRI-ABID, N.; MORJEN, M.; KALLECH-ZIRI, O.; BEZZINE, S.; MARVALDI, J.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N.; LUIS, J. CC-PLA2-1 and CC-PLA2-2, two *Cerastes cerastes* venom-derived phospholipases A2, inhibit angiogenesis both in vitro and in vivo. **Lab Invest**, 90(4): 510-519, 2010.

KHUNSAP, S.; PAKMANEE, N.; KHOW, O.; CHANHOM, L.; SITPRIJA, V.; SUNTRAVAT, M.; LUCENA, S. E.; PEREZ, J. C.; SANCHEZ, E. E. Purification of a phospholipase A(2) from *Daboia russelii siamensis* venom with anticancer effects. **J Venom Res**, 2: 42-51, 2011.

KIDA, Y.; KOBAYASHI, M.; SUZUKI, T.; TAKESHITA, A.; OKAMATSU, Y.; HANAZAWA, S.; YASUI, T.; HASEGAWA, K. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. **Cytokine**, 29(4): 159-168, 2005.

KIM, S. H.; HAN, S. Y.; AZAM, T.; YOON, D. Y.; DINARELLO, C. A. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFalpha. **Immunity**, 22(1): 131-142, 2005.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. **Toxicon**, 27(6): 613-635, 1989.

KINI, R. M.; FOX, J. W. Milestones and future prospects in snake venom research. **Toxicon**, 62: 1-2, 2013.

- KNUDSEN, P. J.; DINARELLO, C. A.; STROM, T. B. Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. **J Immunol**, 137(10): 3189-3194, 1986.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, 227(5259): 680-685, 1970.
- LEE, W. H.; TOYAMA, M. H.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; POLIKARPOV, I. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of piratoxin III, a D-49 phospholipase A₂ from the venom of *Bothrops pirajai*. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 55(Pt 6): 1229-1230, 1999.
- LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat Rev Drug Discov**, 2(10): 790-802, 2003.
- LOMONTE, B., ANGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, 42(8): 885-901, 2003.
- LUSTER, A. D. Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. **New England Journal of Medicine**, 338(7): 436-445, 1998.
- MANDELBAUM, F. R.; HENRIQUES, O. B. Purification and properties of Bothrops protease A. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 104(3): 369-374, 1964.
- MANDELBAUM, F. R.; REICHEL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca). **Toxicon**, 20(6): 955-972, 1982.
- MARANGONI, F. A.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; LANDUCCI, E. C. Unmasking snake venom of *Bothrops leucurus*: purification and pharmacological and

structural characterization of new PLA₂ Bleu TX-III. **Biomed Res Int**, 2013: 941467, 2013.

MASHIMA, T.; SEIMIYA, H.; TSURUO, T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. **Br J Cancer**, 100(9): 1369-1372, 2009.

MCLANE, M. A.; MARCINKIEWICZ, C.; VIJAY-KUMAR, S.; WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I.; NIEWIAROWSKI, S. Viper venom disintegrins and related molecules. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 219(2): 109-119, 1998.

McLANE, M. A.; JOERGER, T.; MAHMOUD, A. Disintegrins in health and disease. **Frontiers in Bioscience**, 13: 6617-6637, 2008.

MENALDO, D. L.; BERNARDES, C. P.; PEREIRA, J. C.; SILVEIRA, D. S.; MAMEDE, C. C.; STANZIOLA, L.; OLIVEIRA, F.; PEREIRA-CROTT, L. S.; FACCIOLI, L. H.; SAMPAIO, S. V. Effects of two serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom on the complement system and the inflammatory response. **Int Immunopharmacol**, 15(4): 764-771, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acidentes por animais peçonhentos. **Instituto Butantan**. São Paulo, Brasil, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento dos acidentes por animais peçonhentos. **Fundação Nacional da Saúde (FUNASA)**. Brasília, Brasil, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2014. Disponível em < [http:// www.saude.gov.br/sinanweb](http://www.saude.gov.br/sinanweb) > Acesso em 25/10/2014.

MOREIRA, V.; ZAMUNER, S. R.; WALLACE, J. L.; TEIXEIRA CDE, F. *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E₂ and D₂, and expression of cyclooxygenases. **Toxicon**, 49(5): 615-624, 2007.

MOREIRA, V.; DOS-SANTOS, M. C.; NASCIMENTO, N. G.; DA SILVA, H. B.; FERNANDES, C. M.; D'IMPÉRIO LIMA; M. R.; TEIXEIRA, C. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon**, 60(1): 12-20, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 65(1-2): 55-63, 1983.

NATARAJ, C.; THOMAS, D. W.; TILLEY, S. L.; NGUYEN, M. T.; MANNON, R.; KOLLER, B. H.; COFFMAN, T. M. Receptors for prostaglandin E₂ that regulate cellular immune responses in the mouse. **J Clin Invest**, 108(8): 1229-1235, 2001.

NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A.; FUKUI, H. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, 33(7): 1843-1849, 1994.

NUNES, D. C.; RODRIGUES, R. S.; LUCENA, M. N.; COLOGNA, C. T.; OLIVEIRA, A. C.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; ARANTES, E. C.; TEIXEIRA, D. N.; UEIRA-VIEIRA, C.; RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A₂ from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, 154(3): 226-233, 2011.

OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, 37(3): 411-445, 1999.

PARQUE NACIONAL DA CANTAREIRA. Disponível em < www.ambiente.sp.gov.br/parque-da-cantareira > Acesso em 22/10/2014.

PONCE-SOTO, L. A.; BONFIM, V. L.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA₂ D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using in vitro neuromuscular preparation. **Protein J**, 25(2): 147-155, 2006.

QUACH, N. D.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Secretory phospholipase A₂ enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. **Biochemical Pharmacology**, 90(4): 338-348, 2014.

ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, J. O.; ASTOLFI-FILHO, S.; NOMIZO, A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R.; SOARES, A. M.; FRANCA, S. C. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom. **Protein J**, 23(4): 273-285, 2004.

RODRIGUES, R. S., IZIDORO, L. F. M., TEIXEIRA, S. S., SILVEIRA, L. B., HAMAGUCHI, A., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S., GIGLIO, J. R., FULY, A. L., SOARES, A. M., & RODRIGUES, V. M. 2007. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, 50(1): 153-165.

ROMERO-VARGAS, F. F.; PONCE-SOTO, L. A.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S. Biological and biochemical characterization of two new PLA₂ isoforms Cdc-9 and Cdc-10 from *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, 151(1): 66-74, 2010.

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; TEIXEIRA, C. F.; FERNANDES, C. M.; DIAZ, C.; GUTIERREZ, J. M. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators Inflamm**, 11(2): 121-128, 2002.

- RUDRAMMAJI, L. M. S.; GOWDA, T. V. Purification and characterization of three acidic, cytotoxic phospholipases A₂ from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. **Toxicon**, 36(6): 921-932, 1998.
- SAGUCHI, K.; HAGIWARA-SAGUCHI, Y.; MURAYAMA, N.; OHI, H.; FUJITA, Y.; CAMARGO, A. C.; SERRANO, S. M.; HIGUCHI, S. Molecular cloning of serine proteinases from *Bothrops jararaca* venom gland. **Toxicon**, 46(1): 72-83, 2005.
- SALVADOR, G. H. M.; CAVALCANTE, W. L. G.; DOS SANTOS, J. I.; GALLACCI, M.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Structural and functional studies with mytoxin II from *Bothrops moojeni* reveal remarkable similarities and differences compared to other catalytically inactive phospholipases A₂-like. **Toxicon**, 72(0): 52-63, 2013.
- SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C.; BELETTI, M. E.; DE OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, 52(8): 908-917, 2008.
- SARRAY, S.; DELAMARRE, E.; MARVALDI, J.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N.; LUIS, J. Lebectin and lebecetin, two C-type lectins from snake venom, inhibit alpha5beta1 and alphaV-containing integrins. **Matrix Biol**, 26(4): 306-313, 2007.
- SAUTEBIN, L. Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. **Fitoterapia**, 71, Supplement 1(0): S48-S57, 2000.
- SCHMITZ, J.; OWYANG, A.; OLDHAM, E.; SONG, Y.; MURPHY, E.; MCCLANAHAN, T. K.; ZURAWSKI, G.; MOSHREFI, M.; QIN, J., LI, X.; GORMAN, D. M.; BAZAN, J. F.; KASTELEIN, R. A IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST₂ and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, 23(5): 479-490, 2005.

SCOPES, R. K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. **Anal Biochem**, 59(1): 277-282, 1974.

SCOTT, K. F.; SAJINOVIC, M.; HEIN, J.; NIXDORF, S.; GALETTIS, P.; LIAUW, W.; DE SOUZA, P.; DONG, Q.; GRAHAM, G. G.; RUSSELL, P. J. Emerging roles for phospholipase A₂ enzymes in cancer. **Biochimie**, 92(6): 601-610, 2010.

SERRANO, S. M.; REICHL, A. P.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E. A.; SANTORO, M. L.; SAMPAIO, C. A.; CAMARGO, A. C.; ASSAKURA, M. T. A novel phospholipase A₂, BJ-PLA₂, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. **Arch Biochem Biophys**, 367(1): 26-32, 1999.

SHIMOHIGASHI, Y.; TANI, A.; MATSUMOTO, H.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI, Y. Lysine-49-phospholipases A₂ from *Trimeresurus flavoviridis* venom are membrane-acting enzymes. **J Biochem**, 118(5): 1037-1044, 1995.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, 1488(1-2): 1-19, 2000.

SLOTTA, K. H.; CONRAT, H. F. Crotoxin. **Nature**, 144: 290-291, 1939.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology, **Annual Review of Biochemistry**, Vol. 69: 145-182, 2000.

SNAKE BITE INITIATIVE. Disponível em < www.snakebiteinitiative.org > Acesso em 23/10/2014.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and Functional Characterization of

BnSP-7, a Lys49 Myotoxic Phospholipase A₂ Homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 378(2): 201-209, 2000.

SOUSA, L. F.; NICOLAU, C. A.; PEIXOTO, P. S.; BERNARDONI, J. L.; OLIVEIRA, S. S.; PORTES-JUNIOR, J. A.; MOURÃO, R. H. V.; LIMA-DOS-SANTOS, I.; SANO-MARTINS, I. S.; CHALKIDIS, H. M.; VALENTE, R. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. **PLoS Negl Trop Dis**, 7(9): e2442., 2013.

STABELI, R. G.; MAGALHAES, L. M.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; OLIVEIRA, E. B. Antibodies to a fragment of the *Bothrops moojenil*-amino acid oxidase cross-react with snake venom components unrelated to the parent protein. **Toxicon**, 46(3): 308-317, 2005.

STAIANO, N., VILLANI, G. R., DI MARTINO, E., SQUILLACIOTI, C., VUOTTO, P., & DI NATALE, P. Echistatin inhibits the adhesion of murine melanoma cells to extracellular matrix components. **Biochem Mol Biol Int**, 35(1): 11-19, 1995.

STREETZ, K. L.; WUSTEFELD, T.; KLEIN, C.; MANNS, M. P.; TRAUTWEIN, C. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, 47(4): 661-673, 2001.

SUN, G. Y.; SHELAT, P. B.; JENSEN, M. B.; HE, Y.; SUN, A. Y.; SIMONYI, A. Phospholipases A₂ and Inflammatory Responses in the Central Nervous System. **Neuromolecular Medicine**, 12(2): 133-148, 2010.

TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, 54(1): 67-76, 2009.

TEIXEIRA, C. F. P.; LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, 42(8): 947-962, 2003.

TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; DA SILVA, F. M.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SILVA, F. P.; JR.; IZIDORO, L. F.; 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 acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. **Arch Toxicol**, 85(10): 1219-1233, 2011.

TOKARNIA C.H.; PEIXOTO P.V. The importance of snake bites as cause of cattle death in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 26(2):55-68, 2005.

TORII, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. **J Biol Chem**, 272(14): 9539-9542, 1997.

TOYAMA DDE, O.; DIZ FILHO, E. B.; CAVADA, B. S.; DA ROCHA, B. A.; DE OLIVEIRA, S. C.; COTRIM, C. A.; SOARES, V. C.; DELATORRE, P.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H. Umbelliferone induces changes in the structure and pharmacological activities of Bn IV, a phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedi*. **Toxicon**, 57(6): 851-860, 2011.

VANE, J.; BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Faseb j**, 1(2): 89-96, 1987.

VESTERBERG, K.; VESTERBERG, O. Studies of staphylokinase. **Journal of Medical Microbiology**, 5(4): 441-450, 1972.

WARD, R. J.; MONESI, N.; ARNI, R. K.; LARSON, R. E.; PACO-LARSON, M. L. Sequence of a cDNA encoding bothropstoxin I, a myotoxin from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Gene**, 156(2): 305-306, 1995.

WARD, R. J.; DE AZEVEDO, W. F.; JR.; ARNI, R. K. At the interface: crystal structures of phospholipases A₂. **Toxicon**, 36(11): 1623-1633, 1998.

WARD, R. J.; CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H.; RULLER, R.; SA, J. M. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochem J**, 362(Pt 1): 89-96, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em < www.who.int/neglected_diseases > Acesso em 26/10/2014.

ZAMUNER, S. R.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; GUTIERREZ, J. M.; DE FATIMA P. T.C. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. **Toxicon**, 46(7): 806-813, 2005.

ZELANIS, A.; ANDRADE-SILVA, D.; ROCHA, M. M.; FURTADO, M. F.; SERRANO, S. M. T.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L. A Transcriptomic View of the Proteome Variability of Newborn and Adult *Bothrops jararaca* Snake Venoms. **PLoS Negl Trop Dis**, 6(3): e1554, 2012.

ZHANG, L.; WU, W. T. Isolation and characterization of ACTX-6: a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon acutus* snake venom. **Nat Prod Res**, 22(6): 554-563, 2008.

ZHOU, X. D.; JIN, Y.; CHEN, R. Q.; LU, Q. M.; WU, J. B.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L. Purification, cloning and biological characterization of a novel disintegrin from *Trimeresurus jerdonii* venom. **Toxicon**, 43(1): 69-75, 2004.

ZOCCAL, K. F.; BITENCOURT CDA, S.; SORGI, C. A.; BORDON KDE, C.; SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C.; FACCIOLI, L. H. Ts6 and Ts2 from *Tityus serrulatus* venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine production. **Toxicon**, 61: 1-10, 2013.

ZOUARI-KESSENTINI, R.; LUIS, J.; KARRAY, A.; KALLECH-ZIRI, O.; SRAIRI-ABID, N.; BAZAA, A.; LORET, E.; BEZZINE, S.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N. Two

purified and characterized phospholipases A₂ from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration. **Toxicon**, 53(4): 444-453, 2009.

ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; ZAMUNER, S. R.; GUTIERREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, 45(3): 335-346, 2005.

ZYCHAR, B. C.; DALE, C. S.; DEMARCHI, D. S.; GONCALVES, L. R. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon**, 55(2-3): 227-234, 2010.