UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

"Caracterização funcional e estrutural de uma nova fosfolipase A_2 ácida de *Bothrops moojeni*"

Lucas Blundi Silveira

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

"Caracterização funcional e estrutural de uma nova fosfolipase A_2 ácida de *Bothrops moojeni*"

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Lucas Blundi Silveira

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Eliane Candiani Arantes

Versão corrigida da **Tese de Doutorado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2011

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silveira, Lucas Blundi

Caracterização Funcional e Estrutural de uma nova Fosfolipase A_2 Ácida de *Bothrops moojeni*. Ribeirão Preto, 2011.

98p. : Il. ; 30cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes

1. *Bothrops moojeni.* 2. Fosfolipase A_2. 3. Inflamação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucas Blundi Silveira

Caracterização Funcional e Estrutural de uma nova Fosfolipase A_2 Ácida de *Bothrops moojeni*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Titulo de Doutor em Ciências.

Area de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Eliane Candiani Arantes

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus por estar sempre ao meu lado,

A minha família por tudo o que fizeram e fazem por mim,

A minha noiva Fabíola por estar sempre comigo.

Agradecimentos

Agradeço inicialmente a minha família pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

Agradeço a minha noiva Fabíola por estar sempre presente em todos os momentos especiais da minha vida. Te amo.

Ao Prof. Dr. Andreimar Martins Soares pela orientação e por todo o comprometimento com a qualidade deste trabalho. Infelizmente não foi possível continuar sob sua orientação, mas o mérito deste trabalho também é seu.

A Prof^{a}. Dr^{a}. Suely Vilela pela acolhida em seu laboratório quando foi necessário.

A Prof^{a}. Dr^{a}. Eliane Candiani Arantes por tudo o que sempre fez pelos alunos. Por toda a ajuda nos momentos em que mais precisávamos.

Aos amigos do laboratório Clayton, Danilo, Norival, Sabrina, Renata, Carolina, Johara, Tássia, Marco Aurélio, Lanuze, Cássio e Raquel pelo companheirismo e apoio. Pessoas fantásticas com as quais aprendi muito e passei bons momentos.

A todos do Laboratório de Inflamação do Instituto Butantan por toda a ajuda e acolhida.

Ao Fernando Fonseca por todo o auxílio e por ter me recebido em sua casa durante a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. José Roberto Giglio, pelo inestimado auxílio sempre prestado.

Ao Beto, pelo apoio técnico.

Aos técnicos do laboratório de Toxicologia da FCFRP, Adélia, João Franco, Luís e Santi pela amizade e auxílio técnico-científico fundamental para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Catarina Teixeira (Instituto Butantan), ao Prof. Dr. Marcos Fontes (UNESP), ao Prof. Dr. Flávio Henrique Silva (UFSCar), ao Prof. Dr. Saulo Luis da Silva (UFSJ) e ao Prof. Dr. André Fuly (UFF) pela colaboração e auxílio na realização deste trabalho.

Aos amigos que acompanharam toda a jornada, sempre apoiando em todos os momentos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Silveira, L. B. **Caracterização funcional e estrutural de uma nova fosfolipase A_2 ácida de *Bothrops moojeni*.** 98f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP, 2011.

As fosfolipases A_2 (PLA_2s) são enzimas que induzem vários efeitos farmacológicos e geralmente, correspondem a maior porcentagem do conteúdo protéico dos venenos de serpentes. Desta forma, o isolamento e a caracterização bioquímica, funcional e estrutural de PLA_2s poderão gerar informações importantes para o melhor entendimento dos efeitos farmacológicos e de efeitos tóxicos ocasionados por estas proteínas. Através de dois métodos cromatográficos (troca-iônica em CM-Sepharose e hidrofóbica em Phenyl-Sepharose) foi isolada uma isoforma de fosfolipase A_2 ácida presente na peçonha da serpente *Bothrops moojeni*, denominada de $BmooPLA_2$. Quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida com agente desnaturante, $BmooPLA_2$ apresentou massa molar relativa de aproximadamente 14.000. A proteína isolada, $BmooPLA_2$, possui uma única cadeia polipeptídica, pI~5,2, é rica em aminoácidos hidrofóbicos, ácidos e possui 14 resíduos de cisteína. Esta isoforma pH-termoestável apresentou alta atividade fosfolipásica. A enzima induziu edema moderado *in vivo*, na concentração de 25 µg. Além disso, a $BmooPLA_2$ foi capaz de inibir a agregação plaquetária de modo dose dependente e induzir efeito hipotensor nas concentrações de 15 e 30 µg . Foi realizada também a construção da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha da serpente *Bothrops moojeni*, onde o cDNA que codifica a proteína $BmooPLA_2$ foi clonado e a proteína recombinante expressa em *E. coli*. Todos os ESTs (Expressed Sequence Tags) foram classificados de acordo com a homologia de sua estrutura primária com sequências conhecidas. As sequencias codificando para toxinas representaram cerca de 30% do total de sequências identificadas. De acordo com o transcriptoma, as toxinas mais expressas pela serpente *Bothrops moojeni* são as metaloproteases (SVMP), as quais correspondem a aproximadamente 77% das toxinas encontradas. A proteína recombinante apresentou a mesma sequência de aminoácidos, atividade fosfolipásica e efeito inibitório sobre plaquetas, observados para a proteína nativa $BmooPLA_2$, sugerindo que a $recBmooPLA_2$ foi expressa, purificada e reenovelada em sua forma ativa. Como nenhum estudo abordou a participação das PLA_2s ácidas de *Bothrops* nos processos inflamatórios e os mecanismos envolvidos na liberação desses mediadores, particularmente os prostanóides, as toxinas nativa e recombinante foram avaliadas quanto ao seu efeito sobre a resposta inflamatória (ensaios sobre leucócitos *in vitro*), avaliando a expressão da enzima COX-2 e liberação do prostanóide PGE2, além de outros mediadores como TXB4 e LTB2, após a incubação com macrófagos isolados, *in vitro*. Com estes resultados foi possível uma melhor compreensão da composição da peçonha desta serpente, bem como um melhor entendimento da participação das PLA_2s ácidas envenenamento ofídico, abrindo novas perspectivas para sua aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: *Bothrops moojeni*, inflamação, biblioteca de cDNA, fosfolipases A_2 ácida, peçonha de serpente.

ABSTRACT

Silveira, L. B. **Functional and structural characterization of a new acidic phospholipase A_2 from *Bothrops moojeni*.** 2011. 98p. Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

The phospholipase A_2 (PLA_2s) are enzymes that induce various pharmacological effects and usually correspond to a higher percentage of the protein content of snake venoms. Thus, isolation, biochemical, functional and structural characterization of PLA_2s may generate important information for a better understanding of the pharmacological effects and toxicity induced by these proteins. Through two chromatographic steps (ion exchange on CM-Sepharose and hydrophobic in Phenyl-Sepharose) an acidic phospholipase A_2 isoform was isolated from the venom of the snake *Bothrops moojeni* and named $BmooPLA_2$. Its biochemical and partial functional characterization were also performed. When submitted to electrophoresis on polyacrylamide gel with denaturing agent (SDS-PAGE), $BmooPLA_2$ presented relative molar mass of approximately 14,000. The isolated protein, $BmooPLA_2$, has a single polypeptidic chain, pI ~ 5.2, is rich in hydrophobic amino acids and has 14 cysteine residues. This pH-thermostable isoform showed high phospholipasic activity. The enzyme induced moderate edema in vivo, at the concentration of 25 µg. In addition, $BmooPLA_2$ was able to inhibit platelet aggregation in a dose dependent manner and showed hypotensive effect at different concentrations (15 and 30 µg). It was also carried out the construction of the cDNA library from the venom gland of the snake *Bothrops moojeni*, where the cDNA encoding the protein $BmooPLA_2$ was cloned and a recombinant protein expressed in *E. coli*. All ESTs (Expressed Sequence Tags) were classified according to their primary structure homology with known sequences. The sequences coding for toxins accounted for approximately 30% of all identified sequences. According to the transcriptome, the majority of the toxins expressed by the snake *Bothrops moojeni* are metalloproteases (SVMP), which correspond to approximately 77% of the toxins found. The recombinant protein presented the same amino acid sequence, phospholipase activity and inhibitory effect on platelets, observed for the native $BmooPLA_2$, suggesting that $recBmooPLA_2$ was expressed, purified and refolded in its active form. Since no study has addressed the involvement of acidic PLA_2s from *Bothrops* genus upon inflammatory processes and the mechanisms involved in the release of such mediators, particularly prostanoids, native and recombinant toxins were evaluated for their effects on the inflammatory response (essays on leukocytes *in vitro*), evaluating the expression of COX-2 and prostanoid release of PGE2, as well as other mediators as TXB4 and LTB2, after incubation with isolated macrophages, *in vitro*. With these results it was possible to better understand the composition of the venom of this snake, and a better understanding of the role of acidic PLA2s on the snake envenomation, opening new perspectives for its biotechnological application.

Keywords: Bothrops moojeni, inflammation, cDNA library, phospholipases A2, snake venom.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do mecanismo de catálise proposto para PLA_2s 6
Figura 2. Cadeia do ácido araquidônico 8
Figura 3. Isolamento da PLA_2 ácida da peçonha de *B. moojeni*..... 32
Figura 4. Caracterização bioquímica da PLA_2 ácida de *B. moojeni*..... 33
Figura 5. Caracterização enzimática da fosfolipase A_2 ácida isolada de peçonha de serpente *B. moojeni*..... 35
Figura 6. Alinhamento da região N-terminal de $BmooPLA_2$ com outras fosfolipases A_2 de peçonhas de serpentes 36
Figura 7. Inibição de agragação plaquetária e efeito hipotensor da $BmooPLA_2$..... 37
Figura 8. Análise da Biblioteca de cDNA da glândula de peçønha da serpente *Bothrops moojeni*..... 38
Figura 9. Sequência completa do cDNA que codifica para a $BmooPLA_2$ 39
Figura 10. Purificação da proteína recombinante..... 40
Figura 11. Efeito da $BmooPLA_2$ nativa e recombinante na hidrólise de substratos fluorescentes (NBD-fosfolipídeos), agregação plaquetária induzida por ADP e efeito hipotensor 41
Figura 12. Efeito da $BmooPLA_2$ nativa e recombinante na expressão de PGE_2, TXB_2 e LTB_4 43
Figura 13. Efeito das toxinas nativa e recombinante na viabilidade de células em cultura 44
Figura 14. Efeito da $BmooPLA_2$ nativa e recombinante na expressão de COX-2 por leucócitos peritoneais 45
Figura 15. Múltiplo alinhamento de sequências de $BmooPLA_2$ e outras PLA_2s de peçonhas de serpentes..... 47
Figura 16. Modelo tridimensional da $BmooPLA_2$ gerado por modelagem teórica por homologia e Diagrama de Ramachandran..... 50
Figura 17. Cristais da $BmooPLA_2$ formados após 15 dias 53
Figura 18. Policristais regulares da $BmooPLA_2$ formados após 12 dias..... 54
Figura 19. Microcristais regulares da $BmooPLA_2$ formados após 18 dias 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades farmacológicas induzidas pelas isoformas de PLA_2s isoladas das peçonhas de *Bothrops moojeni* e *B. jararacussu* 34

LISTA DE ABREVIATURAS

AA:	Ácido araquidônico
ADP:	Adenosina 5'-difosfato
AMBIC:	Bicarbonato de amônio
COX:	Ciclooxigenase
Bis-acrilamida:	N',N' – metilenobisacrilamida
BmooPLA$_2$:	Fosfolipase A2 ácida isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*
EST:	Sequências Alvo Expressas (Expressed Sequence Tags)
LDH:	Lactato desidrogenase
LTB4:	Leucotrieno B4
LPS:	Lipopolissacarídeo
M*r*:	Massa molar relativa
PAGE:	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS:	Tampão fosfato em salina
PA:	Ácido fosfatídico
p-BPB:	Brometo de p-bromofenacila
PC:	Fosfatidilcolina,
PE:	Fosfatidiletanolamina
PG:	Fosfatidilglicerol
PGE2:	Prostaglandina E
PLA$_2$:	Fosfolipase A$_2$
PMN:	Polimorfonucleares
PPP:	Plasma pobre em plaquetas
PRP:	Plasma rico em plaquetas
SD:	"*Standard Deviation*" - Desvio padrão
SDS:	Dodecil sulfato de sódio
SVMP:	metaloproteases de peçonha de serpente
TEMED:	N',N',N',N' – tetrametiletilenodiamina
TXB2:	Tromboxano B2
VEGF:	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

RESUMO ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
LISTA DE FIGURAS ..... **iii**
LISTA DE TABELAS ..... **iv**
LISTA DE ABREVIATURAS ..... **v**

1. INTRODUÇÃO **2**
1.1. Envenenamento ofídico 2
1.2. Fosfolipases A_2 de peçonhas de serpentes 4
1.3. Peçonhas de serpentes e inflamação 7
1.4. Proteômica e genômica de peçonhas de serpentes 12

2. OBJETIVOS **16**
2.1. Objetivo geral 16
2.2. Objetivos específicos 16

3. ANIMAIS, MATERIAIS E MÉTODOS **18**
3.1. Reagentes e resinas 18
3.2. Animais 18
3.3. Peçonha de *B. moojeni* 18
3.4. Isolamento da isoforma ácida de fosfolipase A_2 da peçonha bruta de *B. moojeni* 18
3.5. Caracterização Bioquímica da Fosfolipase A_2 19
3.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes 19
3.5.2. Focalização Isoelétrica 20
3.5.3. Análise da toxina isolada por cromatografia líquida de alta eficiência e SDS-PAGE 20
3.5.4. Espectrometria de massa 20
3.5.5. Sequenciamento da região N-terminal 21
3.5.6. Determinação quantitativa de proteínas 21
3.6. Caracterização Funcional da Fosfolipase A_2 21
3.6.1. Modificação química da $BmooPLA_2$ 21
3.6.2. Atividade hemolítica indireta 21
3.6.3. Atividade enzimática sobre lipídeos fluorescentes 22
3.6.4. Indução de edema 23
3.6.5. Efeitos sobre plaquetas 23
3.6.6. Atividade Hipotensora 23
3.6.7. Atividade miotóxica 24
3.6.8. Atividade anticoagulante 24

3.6.9. Efeitos *in vitro* das fosfolipases A_2 sobre a expressão de mediadores inflamatórios por macrófagos peritoneais 24
3.7. Caracterização Molecular da Fosfolipase A_2 26
3.7.1. Construção da biblioteca de cDNA da serpente *B. moojeni* e seleção do gene de interesse 26
3.7.2. Expressão da fosfolipase A_2 recombinante 27
3.7.3. Purificação e redobramento da proteína recombinante 28
3.8. Caracterização Estrutural da Fosfolipase A_2 29
3.8.1. Alinhamento múltiplo 29
3.8.2. Modelagem molecular 29
3.8.3. Cristalografia 29
3.9. Análise dos resultados 29

4. RESULTADOS 31
4.1. Isolamento e caracterização bioquímica da PLA_2 ácida isolada da peçonha de *B. moojeni* 31
4.2. Construção da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha da serpente *Bothrops moojeni* e expressão da enzima recombinante 38
4.3. Mecanismo de inflamação induzida pela $BmooPLA_2$ 42
4.4. Caracterização estrutural 46
4.4.1 Alinhamento múltiplo 46
4.4.2. Modelagem teórica por homologia 48
4.4.2.1. $BmooPLA_2$ 48
4.4.3. Cristalização da $BmooPLA_2$ 52

5. DISCUSSÃO 56
5.1. Isolamento e caracterização bioquímica da PLA_2 ácida isolada da peçonha de *B. moojeni* 56
5.2. Clonagem e expressão da enzima recombinante 61
5.3. Ensaios sobre inflamação 64
5.4. Caracterização Estrutural 67

6. CONCLUSÃO 71

7. REFERÊNCIAS 73

ANEXO 98
Anexo I - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo 98

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Envenenamento ofídico

As serpentes têm facinado a humanidade desde a antiguidade. Elas figuram entre poucos dos seres vivos que conseguem causar uma resposta – positiva ou negativa – quando se ouve um simples chocalho, ou mesmo se menciona a palavra "cobra". Este interesse provavelmente é devido ao fato de sua peçonha ser extremamente nociva, causando uma série de danos ao organismo, quando em contato com o mesmo.

As serpentes usam suas peçonhas como armas ofensivas incapacitando e imobilizando suas presas (função principal), como ferramentas de defesa contra seus predadores (função secundária) e para ajudar na digestão. Bioquimicamente, peçonhas de serpentes são misturas complexas de proteínas e polipeptídeos farmacologicamente ativos. Todos eles, em conjunto, ajudam na imobilização da presa. Um grande número de toxinas protéicas foram purificadas e caracterizadas a partir de peçonhas de serpentes (RODRIGUES et al., 2007; SANTOS-FILHO et al., 2008; BAZAA et al., 2009; FERNÁNDEZ et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011) as quais geralmente contêm de 30 a mais de 100 toxinas. Algumas dessas proteínas exibem atividades enzimáticas, enquanto várias outras são proteínas não-enzimáticas, além de peptídeos. Com base em suas estruturas, elas podem ser agrupadas em um pequeno número de superfamílias. Os membros em uma única família mostram semelhanças notáveis em suas estruturas primária, secundária e terciária, mas muitas vezes apresentam distintos efeitos farmacológicos (KANG et al., 2011).

Dentre os acidentes por animais peçonhentos, o ofidismo é o principal deles, pela sua frequência e gravidade. Ocorre em todas as regiões e estados brasileiros e é um importante problema de saúde pública, quando não se institui a soroterapia de forma precoce e adequada. Em 2010, no Brasil foram registrados, 29.635 acidentes por serpentes, sendo 85% ocasionados por serpentes peçonhentas, 4% por não-peçonhentas e 11% por serpentes não identificadas.

No Brasil a maior parte dos acidentes ocorre nos meses mais quentes e chuvosos (janeiro a maio), com uma letalidade geral em torno de 0,4%. Os valores de letalidade detectados para os diversos tipos de acidentes assim se distribuem: botrópico, 0,3%; crotálico, 1,9%; laquético, 0,9% e elapídico, 0,3%. Em cerca de 19% dos óbitos não são informados os gêneros das serpentes envolvidas nos acidentes. Cerca de 73% dos acidentes são atribuídos às serpentes do gênero *Bothrops* e 12% ao gênero *Crotalus*. Outros gêneros de serpentes, como *Lachesis* (3%) e *Micrurus* (1%) são de ocorrência mais rara e comportamento menos agressivo, resultando em menor número de acidentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Do ponto de vista médico, o gênero *Bothrops* é o mais importante já que, como citado anteriormente, é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil anualmente. As serpentes deste gênero habitam preferencialmente ambientes úmidos como matas, áreas cultivadas e locais de proliferação de roedores, em zonas rurais. Possuem hábitos noturnos e são consideradas serpentes muito agressivas (FRANÇA e MÁLAQUE, 2003).

O gênero *Bothrops* compreende cerca de 30 espécies, distribuídas por todo território nacional. As espécies mais conhecidas são: *B. atrox,* encontrada no norte do Brasil; *B. neuwiedi,* encontrada em todo o território nacional, exceto região norte do país; *B. jararaca,* distribuída na região sul e sudeste; *B. jararacussu*, encontrada no cerrado da região central e em florestas tropicais do sudeste, *B. alternatus,* distribuída ao sul do país e *B. moojeni*, encontrada nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia (BARRAVIERA, 1991; JORGE e RIBEIRO, 1992).

De acordo com o Ministério da Saúde (2005), o acidente botrópico é caracterizado por processo inflamatório no local da picada, edema intenso, equimose, dor e adenomegalia regional que progridem ao longo do membro acometido; bolhas com conteúdo seroso ou sero-hemorrágico e, eventualmente, necrose cutânea. Sistemicamente, há alteração da coagulação sanguínea e sangramentos espontâneos (gengivorragia, equimoses, hematomas pós-trauma e hematúria). Pacientes acometidos por envenenamentos por serpentes deste gênero podem apresentar complicações como: abscesso, síndrome compartimental, necrose com amputação e/ou sequela funcional, sangramento intenso, choque e insuficiência renal aguda.

Geralmente, o diagnóstico clínico é baseado nas manifestações apresentadas pelo paciente, quando não há identificação do animal. Na ausência de alterações clínicas, o paciente deve ser mantido em observação por 6 a 12 horas após o acidente e, caso o quadro permaneça inalterado, deve ser considerada a possibilidade de acidente por serpente não-peçonhenta ou acidente por serpente peçonhenta sem envenenamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

As peçonhas de serpentes são ricas fontes de compostos com um amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas. Estas peçonhas são compostas por uma complexa mistura de toxinas e outras substâncias bioativas, sendo que, mais de 90% do seu peso seco é constituído por proteínas, compreendendo grande variedade de enzimas como proteases (metalo e serino), fosfolipases A_2, L-aminoácido oxidases, esterases entre outras (VARANDA e GIANINNI, 1999; MATSUI, FUJIMURA, TITANI, 2000; BAILEY e WILCE, 2001; MEBS, 2001; ROBERTO et al., 2004a; CALVETE et al., 2007; AKAO et al., 2010).

1.2. Fosfolipases A_2 de peçonhas de serpentes

As fosfolipases A_2 (PLA_2s; E.C. 3.1.1.4) compreendem uma grande família de proteínas, as quais possuem a mesma função enzimática e demonstram uma considerável homologia quanto à sequência de aminoácidos. Estas enzimas têm sido identificadas e caracterizadas em tecidos de mamíferos, bem como em peçonhas de artrópodes e serpentes (SUZUKI et al., 2000; HIGUCHI et al., 2007; MAITY et al., 2007; TSAI et al., 2007; PONCE-SOTO et al., 2007a; ZOUARI-KESSENTINI et al., 2009; XIN et al., 2009; GARCIA-DENEGRI et al., 2010). As PLA_2s catalisam a hidrólise de 2-*sn*-fosfolipídeos em ácidos graxos e lisofosfolipídeos, a qual está relacionada com importantes atividades farmacológicas, tais como efeito sobre plaquetas, neurotoxicidade, atividade anticoagulante e miotoxicidade (OHNO et al., 2003; GUTIÉRREZ e OWNBY, 2003; SANTOS-FILHO et al., 2008; DE PAULA et al., 2009).

De acordo com a atual classificação, proposta por SCHALOSKE e DENNIS (2006), essas proteínas constituem uma superfamília de diferentes enzimas pertencentes a 15 grupos e seus subgrupos, e incluem cinco tipos distintos de enzimas: as denominadas PLA_2s secretadas ($sPLA_2$), as citosólicas ($cPLA_2$), as independentes de Ca^{2+} ($iPLA_2$), as acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH) e as lisossomais. O sistema de classificação agrupa estas enzimas considerando características como sua origem, sequência de aminoácidos e mecanismos catalíticos, entre outras.

As $sPLA_2$s possuem M*r* variando entre 13.000 e 18.000, usualmente contendo de 5 a 8 pontes dissulfeto. São enzimas que apresentam uma histidina no sítio ativo e requerem a presença do íon Ca^{2+} para a catálise. As fosfolipases A_2 dos grupos IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII, XIV são representantes das $sPLA_2$s.

As $cPLA_2$s são grandes proteínas com M*r* entre 61.000 e 114.000 que utilizam um resíduo de serina no sítio catalítico (grupos IVA, IVB, IVC, IVD, IVE, IVF).

As $iPLA_2$s são enzimas que também utilizam uma serina para catálise (grupos VIA-1, VIA-2, VIB, VIC, VID, VIE, VIF).

As PAF-AH são fosfolipases A_2 com serina no sítio catalítico que hidrolisam o grupo acetil da posição *sn*-2 de fatores ativadores de plaquetas (PAF), cujos grupos representantes são VIIA, VIIB, VIIIA, VIIB.

As PLA_2s lisossomais estão reunidas no grupo XV e são enzimas com pH ótimo próximo a 4,5, que possuem resíduos de histidina e aspartato conservados sugerindo a presença da tríade catalítica Ser/His/Asp, e também uma suposta sequência sinal N-terminal e sítios de glicosilação N-ligados.

Com o descobrimento de uma grande variedade de fosfolipases A_2 na década passada e a atual expansão de pesquisas na área, mais PLA_2s deverão ainda ser descobertas (SIX e DENNIS, 2000; MURAKAMI e KUDO, 2004; SCHALOSKE e DENNIS, 2006).

As peçonhas de serpentes são ricas em PLA_2s dos grupos I e II, sendo que as enzimas da classe I são encontradas em serpentes das famílias Elapidae e Hydrophiidae e as enzimas do grupo II, nas famílias Crotalidae e Viperidae (SCHALOSKE; DENNIS, 2006; BURKE; DENNIS, 2009). As PLA_2s miotóxicas da classe IIA têm sido subdivididas em dois grupos: as Asp49, cataliticamente ativas; e as Lys49, cataliticamente inativas. A ausência de atividade catalítica não afeta a miotoxicidade. A maioria das PLA_2s das serpentes do gênero *Bothrops* já descritas são proteínas básicas, com ponto isoelétrico entre 7-10, demonstrando ou não atividades catalítica, miotóxica, edematogênica e anticoagulante (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; OWNBY et al., 1999; SOARES et al., 2004a,b; PONCE-SOTO et al., 2006; ABREU et al., 2007). Por outro lado, as PLA_2s ácidas presentes nas peçonhas de serpentes deste gênero foram pouco estudadas e pouco se sabe sobre o mecanismo de ação destas enzimas (SERRANO et al., 1999; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; FULY et al., 2002; COGO et al., 2006; DE ALBUQUERQUE MODESTO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2011).

Em geral, as PLA_2s ácidas de *Bothrops* não apresentam efeitos tóxicos diretos sobre tecidos, mas induzem importantes efeitos farmacológicos como inibição da agregação plaquetária e hipotensão arterial (SERRANO et al., 1999; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; ROBERTO et al., 2004a, b; TEIXEIRA et al., 2009; GARCIA-DENEGRI et al., 2010). Entretanto, algumas exceções foram descritas como: uma PLA_2 de *Bothrops alternatus* que induz hemorragia pulmonar e necrose em células do músculo cardíaco de murinos (NISENBOM et al., 1986; 1988) e outra recentemente isolada de *Bothrops pauloensis*, denominada Bp-PLA_2 que induz mionecrose (RODRIGUES et al., 2007). Fuly e colaboradores demonstraram que as PLA_2s ácidas da peçonha de *Lachesis muta* também eram capazes de induzir mionecrose e inibir a agregação plaquetária (FULY et al., 1997; 2000; 2002). Estas enzimas de caráter ácido ainda merecem maiores estudos na tentativa de melhor entender a correlação entre estrutura, função catalítica e tóxica, além de elucidar suas possíveis aplicações farmacológicas.

A atividade catalítica das PLA_2s apresenta um papel chave em certos efeitos farmacológicos como atividade sobe pressão arterial, sobre plaquetas e miotoxicidade (CHANG e SU, 1982; DÍAZ-OREIRO e GUTIÉRREZ, 1997), entretanto, estudos demonstram que certos efeitos farmacológicos são independentes das atividades catalíticas destas enzimas (KINI e EVANS, 1997; PÁRAMO et al., 1998; SOARES et al., 2001). A ausência de uma estreita correlação entre essas duas atividades aliada à diversidade de efeitos

biológicos destas proteínas, aumentam o interesse sobre quais seriam as bases estruturais para suas funções biológicas.

Evidências sugerem que estas atividades podem ser mediadas por interações entre PLA_2s e aceptores endógenos na membrana da célula alvo (LAMBEAU e LAZDUNSKI, 1999; HANASAKI e ARITA, 1999; VALENTIN e LAMBEAU, 2000).

O mecanismo catalítico da reação PLA_2-fosfolipídio envolve o ataque nucleofílico de uma molécula de água na ligação *sn*-2 do substrato fosfolipídico (Figura 1). No modelo proposto, o próton na posição 3 do anel imidazólico do resíduo His48 envolvido em uma forte interação com o grupo carboxilato do Asp99, impede que ocorra rotação do anel imidazólico e mantém o nitrogênio da posição 1, deste anel, em posição espacial apropriada. Uma molécula de água promove então o ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do substrato e, nesse momento, o anel imidazólico da His48 recebe um próton da molécula de água, facilitando a reação. Subsequentemente à hidrólise da ligação acil-éster na posição *sn*-2 do fosfolipídeo, este próton é doado pelo anel imidazólico para o oxigênio, que forma então o grupo álcool do lisofosfolipídeo a ser liberado juntamente com o ácido graxo (VERHEIJ et al., 1980; ARNI e WARD, 1996; DE OLIVEIRA et al., 2007).

O íon Ca^{2+}, coordenado pelo resíduo Asp49, uma molécula de água e os átomos de oxigênio dos resíduos Gly30, Trp31 e Gly32 (não ilustrados), são responsáveis pela estabilização do intermediário reativo (ARNI e WARD, 1996).

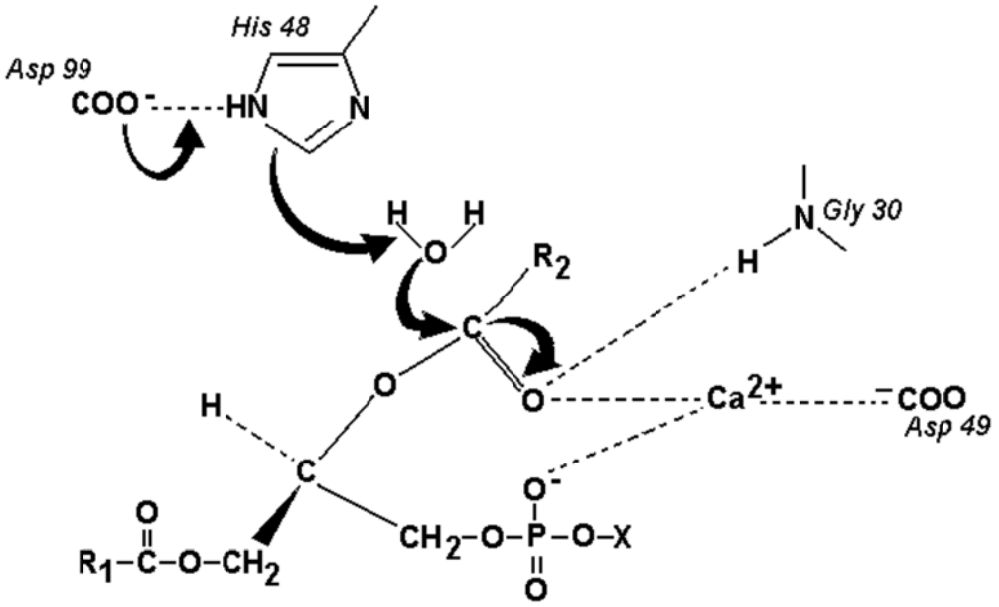


Figura 1. Representação esquemática do mecanismo de catálise proposto para PLA_2s. Interação dos resíduos do sítio catalítico de $sPLA_2$s e o íon cálcio com o estado de transição da reação catalítica no qual uma molécula de água polarizada pelos resíduos H48 e D99 se liga ao grupo carbonila do substrato (VERHEIJ et al., 1980).

A associação entre a atividade catalítica e o processo patológico causado por essas enzimas tem sido objeto de vários estudos nas últimas décadas (MURAKAMI et al., 1997; RODRIGUES et al., 2004; RODRIGUES et al., 2007; COSTA et al., 2008; SANTOS-FILHO et al., 2008).

Serrano e colaboradores (1999) isolaram uma PLA_2 ácida da peçonha de *B. jararaca*, a Bj-PLA_2, que induz inibição da agregação plaquetária e apresenta um alto grau de homologia sequencial com outras PLA_2s ácidas de peçonhas. Outra PLA_2 ácida não-tóxica também foi isolada da peçonha de *B. jararacussu*, denominada de BthA-I-PLA_2 e caracterizada em nível funcional e estrutural (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; ROBERTO et al., 2004a; b; MAGRO et al., 2003; 2005).

Cogo e colaboradores (2006) purificaram, sequenciaram e analisaram estruturalmente duas fosfolipases A_2 ácidas miotóxicas, da peçonha da serpente *B. insularis*, com pIs de 5,0 e 4,4 e massa molar de 13.900 e 13.700 Da, respectivamente. Modesto e colaboradores (2006) purificaram, clonaram e caracterizaram uma PLA_2 ácida, com pI de 4,6 e massa molar de 13.600 Da da peçonha da serpente *B. erythromelas*, com uma potente ação de inibição plaquetária e indução de liberação de prostaglandinas I_2 por células endoteliais.

A espécie *Bothrops moojeni*, de nome popular caissaca, distribui-se geograficamente em áreas restritas de formação aberta, estendendo-se do Brasil Central até o sul do Estado do Paraná (CAMPBELL; LAMAR, 1989). A partir da peçonha da serpente *B. moojeni* foram isoladas: metaloproteases, serinoproteases, PLA_2s miotóxicas e L-aminoácido oxidases (IZIDORO et al., 2006; BERNARDES et al., 2008; SANT`ANA et al., 2008; SANTOS-FILHO et al., 2008; GOMES et al., 2009). Alguns estudos com isoformas de PLA_2s ácidas e básicas já foram descritos (LOMONTE et al., 1990; SOARES et al., 1998b; 2000a; WATANABE et al., 2005; STÁBELI et al., 2006; SANTOS-FILHO et al., 2008; PERCHUC et al., 2010).

1.3. Peçonhas de serpentes e inflamação

Desde a descoberta de que as PLA_2s são enzimas chave na liberação de ácido araquidônico, substrato para a biossíntese de diversos mediadores inflamatórios lipídicos como prostaglandinas, prostaciclinas, tromboxano e leucotrienos (Fig. 2), o estudo dos efeitos inflamatórios dessa classe de enzimas aumentou consideravelmente (para revisão ver TEIXEIRA et al., 2003b).

Peçonhas de serpentes da família Viperidae contêm PLA_2s da classe II, que possuem estreita similaridade com as PLA_2s secretadas da classe II-A, presentes em exudatos

inflamatórios de mamíferos (KAISER et al., 1990; KINI, 1997; TEIXEIRA et al., 2009). Contudo, estudos compreensivos a cerca da atividade dessas PLA_2s no processo inflamatório ainda são escassos.

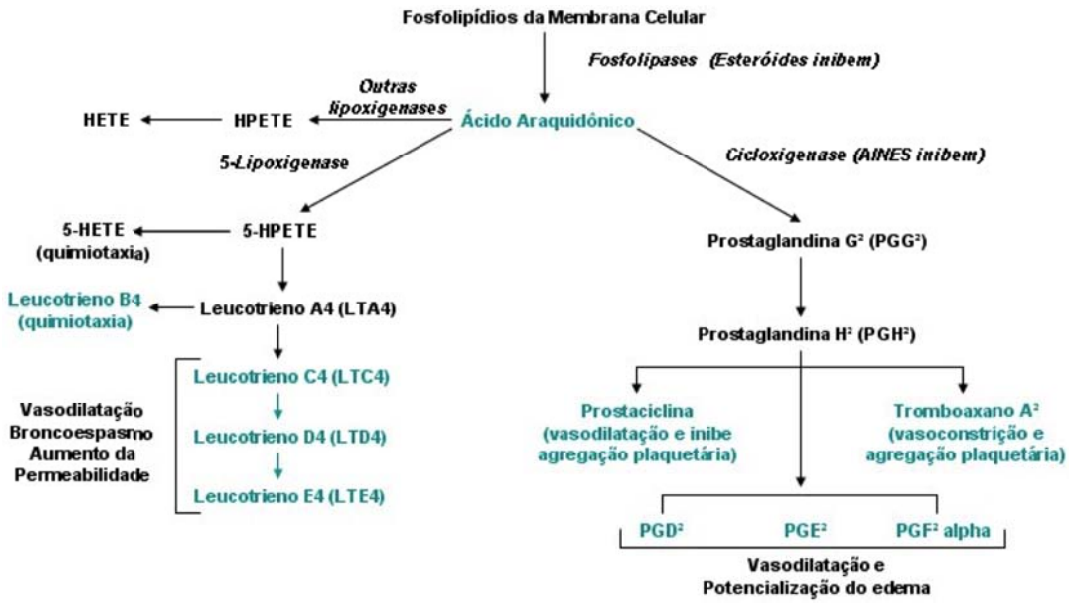


Figura 2. Cadeia do ácido araquidônico. Imagem retirada do site http://migre.me/7EUrb

A inflamação é um mecanismo de defesa caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular, edema e migração de leucócitos dos vasos sanguíneos para o local da inflamação. Durante a fase aguda da inflamação, os neutrófilos são as primeiras células a se acumular no tecido lesionado (RYAN e MAJNO, 1977). A migração de leucócitos é um processo que ocorre em diversas etapas, que é caracterizado por uma interação inicial fraca com o endotélio, mediada por moléculas de adesão, seguida de uma adesão firme e posterior transmigração (ZAMUNER e TEIXEIRA, 2002). A fase inicial de adesão, o rolamento dos neutrófilos, é mediada por membros da família das secretinas (L-secretina nos neutrófilos, P-secretina e E-secretina nas células endoteliais). Em seguida, a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) (CD54), que pertence à superfamília das imunoglobulinas, se liga ao antígeno associado à função de leucócitos (LFA-1) (CD11/CD18) (SMITH et al., 1989). Esta interação resulta em uma firme adesão dos neutrófilos ao endotélio, o que é necessário para a migração transendotelial das células (CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU et al., 1997). Finalmente, as moléculas de adesão plaqueta-endotélio celular (PECAM-1) (CD31) são requeridas para a ativação da passagem através das junções endoteliais e/ou membrana basal

(WAKELIN et al., 1996). Cada molécula de adesão está envolvida em uma fase diferente da migração leucocitária através do endotélio, e a sincronização das suas expressões e funções é essencial para o recrutamento de leucócitos da circulação sanguínea para o tecido (CROCKETTI-TORABI, 1998).

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea e permanecem pouco tempo no sangue periférico. Possuem a capacidade de migrar para os tecidos, mediante a presença de estímulos quimiotáticos. Estas células desempenham um papel importante na eliminação de agentes estranhos, pela fagocitose e geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de liberarem agentes hidrolíticos, estocados em grânulos (KASAMA et al., 1993). Ainda, os neutrófilos são capazes de liberar metabólitos do ácido araquidônico, como os eicosanóides e o PAF (fator ativador de plaquetas) (SYRBU et al., 1999), expressar as enzimas ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e produzir citocinas, como as interleucinas 1, 6 e 8 (IL-1, IL-6 e IL-8) e o fator de necrose tumoral α (TNF-α) (NIIRO et al., 1997; MALONEY et al., 1998).

Os prostanóides são moléculas de natureza lipídica, sintetizados a partir de um ácido graxo essencial, que possui 20 átomos de carbono e três, quatro ou cinco duplas ligações – ácido-5,8,11,14–eicosatetraenóico – denominado ácido araquidônico (COREY et al., 1980).

Gerado pela hidrólise de fosfolipídeos de membrana pelas PLA_2s, o ácido araquidônico é rapidamente metabolizado por diversos complexos enzimáticos, que incluem as COX, as lipoxigenases e o citocromo P_{450}. A ação destas enzimas promove a síntese dos eicosanóides, que incluem as prostaglandinas (PG) ou prostanóides, os leucotrienos (LT) (YOKOMIZO et al., 1997; SARAU et al., 1999), os ácidos hidro-peróxi- (HPETE) e hidróxi-eicosatetraenóicos (HETE), os epóxidos (EET) (CHEN et al., 1999), as lipoxinas (LX) (SERHAN; TAKANO; MADDOX, 1999) e as hepoxilinas (PACE-ASCIAK et al., 1999), além de outros produtos que não são formados enzimaticamente (KHASELEV e MURPHY, 1999).

As peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* induzem, em geral, um quadro fisiopatológico caracterizado por efeitos sistêmicos e reações locais imediatas. Os efeitos sistêmicos envolvem alterações da coagulação sanguínea e do sistema cardiovascular (AMARAL et al., 1985). As reações locais são caracterizadas por hemorragia, mionecrose e inflamação intensa, com edema proeminente e dor (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989).

A inflamação local é uma característica proeminente dos envenenamentos ofídicos por serpentes do gênero *Bothrops* (OLIVO et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2009), e seus efeitos

não são completamente combatidos com os tratamentos convencionais (GUTIÉRREZ et al., 2007; ESPINO-SOLIS et al., 2009). Esse fenômeno é multimediado e a resposta edematogênica local, induzida pela peçonha botrópica, envolve a participação de mediadores α e β-adrenérgicos, do fator ativador de plaquetas (PAF), da serotonina e da histamina, além de eicosanóides, derivados do ácido araquidônico (TREBIEN e CALIXTO, 1989; CHAVES et al., 1995, MOREIRA et al., 2007, 2009). A participação de eicosanóides também foi observada no desenvolvimento da hiperalgesia induzida pelas peçonhas de *B. jararaca* (TEIXEIRA et al., 1994) e de *B. asper* (CHACUR et al., 2001). Desse modo, um melhor entendimento do mecanismo de ação dessas PLA_2s no processo inflamatório pode nos dar importantes informações para melhor entender a ação da peçonha e seus constituintes e auxiliar no desenvolvimento de possíveis formas de tratamento.

Embora as PLA_2s do grupo IIA estejam presentes em níveis significativamente elevados nos locais de inflamação em doenças imunomediadas, o papel dessas enzimas na produção de PG em leucócitos relacionadas com patologia inflamatória ou nas manifestações clínicas *in vivo* de inflamação não está claro. Devido à sua gama de efeitos farmacológicos, as PLA_2s de peçonha de serpente constituem uma excelente ferramenta para investigar os efeitos dessas enzimas em diferentes tipos de leucócitos, no que diz respeito à formação de prostaglandinas.

As peçonhas de serpentes da família Viperidae, de forma geral, são mais abundantes em PLA_2s básicas com atividade miotóxica e outras atividades (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995). Um exemplo de enzimas deste grupo é a miotoxina III (MT-III), uma PLA_2 Asp49 cataliticamente ativa isolada da peçonha de *Bothrops asper* (KAISER et al., 1990). Além da miotoxicidade, a MT-III purificada provoca inflamação local dependente da produção de mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico (AA) (LOMONTE et al., 1993; CHAVES et al., 1998; CHACUR et al., 2003). Recentemente, foi demonstrado que a MT-III ativa as funções dos macrófagos em cultura (ZULIANI et al. 2005b), induz influxo de leucócitos e produção de citocinas inflamatórias, bem como mediadores lipídicos derivados do AA, no peritônio de camundongos (ZULIANI et al., 2005a).

No caso das PLA_2s de serpentes da familia Viperidae, uma diferença funcional foi descrita entre um grupo de PLA_2s básicas miotóxicas, presente em muitas peçonhas, que são miotóxicas mas não neurotóxicas, e que são capazes de interagir e lisar diferentes tipos de células; e a crotoxina B, que é uma PLA_2 miotóxica e neurotóxica e com uma especificidade mais restrita (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; GUTIÉRREZ e OWNBY, 2003). Moreira e colaboradores (2008) relataram que a MT-III provocou a biossíntese de PGE2 e expressão de

COX-2 em macrófagos isolados. Além disso, os resultados mostraram que a MT-III alterou a expressão da proteína COX-2 em neutrófilos isolados, sem alterar a expressão constitutiva de COX-1. Embora alguns estudos tenham relatado a indução da expressão de COX-2 em vários tipos celulares, como monócitos (HERNÁNDEZ et al., 2002), mastócitos (TADA et al., 1998), macrófagos (MOREIRA et al., 2008) e fibroblastos reumatóides sinoviais humanos (BIDGOOD et al., 2000), estes estudos forneceram a primeira evidência de que as PLA_2s do grupo IIA provenientes de peçonhas de serpente, podem estimular diretamente a expressão do mRNA de COX-2 e a expressão dessa proteína em neutrófilos. Além disso, a MT-III induziu uma liberação acentuada de AA e PGE2 por essas células. Portanto, a partir deste estudo sugere-se que PGE2 liberada por neutrófilos é um mediador crítico para a permeabilidade vascular, edema local e hiperalgesia induzida *in vivo* pela MT-III (CHAVES et al., 1998; CHACUR et al., 2003).

Outra PLA_2 do grupo II extensamente caracterizada é a crotoxina, uma enzima heterodimérica isolada a partir da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, que exerce forte neurotoxicidade e miotoxicidade (BON, 1997; SAMPAIO et al., 2010). A crotoxina é formada por uma subunidade PLA_2 básica, crotoxina B, e uma subunidade menor, enzimaticamente inativa, crotoxina A, que atua como uma chaperona potencializando a toxicidade da crotoxina B (CB) (HABERMANN e BREITHAUPT, 1978; BON et al., 1989; BON, 1997). Apesar de ter menor toxicidade que a crotoxina, a CB também exerce atividade neurotóxica e miotóxica (KOUYOUMDJIAN et al., 1986; SOARES et al., 2001; GUTIÉRREZ et al., 2008). A crotoxina provoca lesões inflamatórias e eventos anti-inflamatórios, dependendo do modelo experimental utilizado (CAMARA et al., 2003; SAMPAIO et al., 2005). Estudos *in vitro* demonstraram que a CB induz a liberação de mediadores lipídicos derivados do AA em macrófagos isolados, que foram associados com seus efeitos anti-inflamatórios (SAMPAIO et al., 2006).

Apesar do papel bem conhecido dos mediadores lipídicos derivados do AA em processos fisiológicos e patológicos, os mecanismos responsáveis pela produção de prostanóides induzida pelas PLA_2s de peçonhas tem sido pouco estudados. Além disso, uma vez que a interação entre certas PLA_2s e a COX resultam na produção de prostaglandinas nos locais de inflamação, é importante estudar como essas PLA_2s produzem prostaglandinas e seus possíveis papéis na regulação da COX.

1.4. Proteômica e genômica de peçonhas de serpentes

O campo da proteômica de peçonhas de serpentes tem sido estudado desde os primeiros ensaios bioquímicos, onde foi descoberto que estas peçonhas são compostas de uma complexa mistura de substâncias bioativas, em sua maioria proteínas. Apenas com o ressurgimento da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida ("2D PAGE") e os recentes desenvolvimentos nas técnicas de espectrometria de massa para a identificação e caracterização de proteínas, juntamente com o transcriptoma das glândulas de peçonha, foi que os campos da proteômica e genômica de peçonhas animais se desenvolveram e nos forneceram importantes informações sobre a "venômica" (composição das toxinas de peçonhas) (FOX et al., 2006).

A análise de misturas altamente complexas de proteínas, como o proteoma de peçonhas de serpentes, geralmente requer o uso de métodos de separação multidimensionais. Técnicas proteômicas têm sido utilizadas para estudar a estrutura, função e controle dos sistemas biológicos e processos através da análise sistemática e quantitativa de diversas propriedades das proteínas. Identidade, abundância, estrutura e atividade de proteínas expressas são alguns dos fatores analisados utilizando as técnicas de proteômica (PENG e GYGI, 2001).

O desenvolvimento de novos tratamentos para acidentes ofídicos é de grande importância para a população e a caracterização bioquímica dos peçonhas de serpentes é essencial, pois o tratamento do acidente depende da composição da peçonha. Além do que, estudos anteriores demonstraram que alguns componentes das peçonhas de serpentes possuem um grande potencial no tratamento de várias condições fisiopatológicas. Enzimas do peçonhas de cobra (*Naja sp.*) mostraram promissores resultados no tratamento e prevenção dos males de Parkinson e Alzheimer (BARKER et al., 2000; ZHAO; YEH; NARAHASHI, 2001), e as peçonhas das serpentes da família das Viperidae têm demonstrado atividade anti-tumoral (MARCINKIEWICZ et al., 2003). Consequentemente a elucidação de perfis proteômicos específicos de peçonhas de serpentes podem ter uma vasta implicação na medicina.

Diversos estudos têm descrito a análise de peçonhas de serpentes utilizando técnicas de proteômica (RIOUX et al., 1998; PIMENTA et al., 2001; FRY et al., 2003; NAWARAK et al., 2003), tanto na caracterização de peçonhas brutas (JUAREZ; SANZ; CALVETE, 2004; BAZA et al., 2005; YANES et al., 2007; CALVETE; MARCINKIEWICZ; SANZ, 2007) quanto de proteínas isoladas (LI et al., 2004; SERRANO et al., 2005).

A análise de sequências alvo expressas (ESTs) é um eficiente meio para a descoberta de genes, padrões de expressão (ADAMS et al., 1991; AZAM et al., 1996; JUNQUEIRA-DE-

AZEVEDO; HO, 2002) e desenvolvimento de recursos úteis para o estudo da genômica funcional. Além disso, a classificação e análise do perfil de genes da glândula de peçonha de serpentes é um requisito essencial para a produção de moléculas recombinantes, necessárias para a elucidação dos possíveis mecanismos de ação destas toxinas e descobrir seus antagonistas (ROBERTO et al., 2004; CARDOSO et al., 2011)

A existência, em uma mesma peçonha, de uma diversidade de isoformas de proteínas em uma mesma família, diferindo umas das outras em seus efeitos farmacológicos, reflete uma duplicação gênica e uma acelerada evolução Darwiniana (MOURA-DA-SILVA; THEAKSTON; CRAMPTON, 1996; DESHIMARU et al., 1996; MÉNEZ, 2002; TANI et al., 2002; CALVETE et al., 2003). O fato de que membros da mesma família de proteínas mostram uma notável semelhança estrutural, mas divergem em seus alvos biológicos, fazem delas valiosas ferramentas biotecnológicas para o estudo de processos fisiológicos. Estas moléculas representam desafios interessantes para a elucidação da correlação estrutura-função, podendo levar à construção de novas drogas de uso clínico, tanto no tratamento de alguma doença, como em envenenamentos severos.

Cidade et al. (2006) relataram um estudo onde foram geradas e analisadas 2318 sequências alvo expressas (ESTs) de uma biblioteca de cDNA da glândula de peçonha da serpente *Bothrops jararaca* na tentativa de descrever seu conteúdo protéico. Transcriptomas semelhantes têm sido realizados com outras serpentes, como *B. insularis* (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO e HO, 2002), *Bitis gabonica* (FRANCISCHETTI et al., 2004), *B. jararacussu* (KASHIMA et al., 2004), *Lachesis muta* (JUNQUEIRA DE AZEVEDO et al., 2006), *Deinagkistrodon acutus* (ZHANG et al., 2006), *Philodryas olfersii* (CHING et al., 2006), *B. atrox* (NEIVA et al., 2009) e *B. alternatus* (CARDOSO et al., 2011). Este tipo de estudo é uma ótima fonte de informação sobre a composição das peçonhas, eventualmente levando à descoberta de novas toxinas.

Através da construção de bibliotecas genômicas têm-se estudado a composição de diversas peçonhas, bem como de algumas proteínas isoladas como, por exemplo, o fator de crescimento vascular endotelial e lectinas tipo C da peçonha de *B. insularis* (JUNQUEIRA DE AZEVEDO et al., 2001; GUIMARÃES-GOMES et al., 2004), fator de crescimento neural de *B. jararacussu* (KASHIMA et al., 2002), fosfolipases A_2 da peçonha de *B. jararacussu* (ROBERTO et al., 2004a,b), além da oportunidade de se encontrarem novas toxinas (JIANG et al., 2011),

Uma base de dados de ESTs pode ser utilizada como uma referência auxiliar nos estudos de proteômica levando a uma fácil e rápida identificação das proteínas (MATHESIUS

et al., 2001; CARDOSO et al., 2011) e, consequentemente, a uma possível utilização dessas proteínas, ou parte delas, como futuras drogas no tratamento de acidentes ofídicos, ou no tratamento de algumas patologias como, por exemplo, hipertensão arterial e câncer.

Considerando que nenhum estudo abordou de forma completa as toxinas que compõem a peçonha da Viperidae *B. moojeni*, a construção e análise de uma biblioteca de cDNA é fundamental para compreender as bases moleculares e funcionais desses compostos.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho buscou caracterizar estrutural e funcionalmente uma fosfolipase A_2 ácida isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*, assim como realizar a clonagem e expressão desta enzima recombinante, comparando-a com a isoforma nativa.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Isolamento e caracterização bioquímica parcial da PLA_2 ácida da peçonha de *B. moojeni* (utilizando técnicas cromatográficas de troca iônica, interação hidrofóbica e HPLC; eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), espectrometria de massa, focalização isoelétrica e sequênciamento N-terminal);

2.2.2. Clonagem e expressão da PLA_2 ácida de *B. moojeni* (expressão em *E. coli*, redobramento e purificação da enzima recombinante);

2.2.3. Caracterização funcional comparativa das PLA_2s ácidas nativa e recombinante.

2.2.3.1. Determinação das atividades enzimática;

2.2.3.2. Determinação da atividade edematogênica;

2.2.3.3. Efeitos sobre a inflamação:

2.2.3.3.1. Estudo dos efeitos *in vitro* das PLA_2s sobre a expressão de mediadores inflamatórios por macrófagos peritoneais.

a) Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos;

b) Determinação da citotoxicidade das PLA_2s sobre macrófagos;

d) Análise da expressão protéica de COX-2 por *Western blot*;

e) Purificação e quantificação de eicosanóides.

2.2.4. Caracterização estrutural (cristalografia e modelagem molecular).

2.2.3. Analise da sequência por homologia.

3. Materiais e Métodos

3. ANIMAIS, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e resinas

Os reagentes Acil 6:0 NBD-fosfolipídios, NBD-fosfatidilcolina (PC), NBD-fosfatidilglicerol (PG), NBD-fosfatidiletanolamina (PE) e ácido fosfatídico (PA) foram adquiridos de Avanti Polar Inc., Alabastro, AL, EUA. Resinas CM-Sepharose e Phenyl-Sepharose foram adquiridas da Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2. Animais

Camundongos *Swiss* machos, pesando entre 18-25 g, bem como um exemplar da serpente *Bothrops moojeni* foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto-SP. Os cuidados com os animais foram realizados de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, sob o n º 07.1.515.53.0 (ANEXO I) e Instituto Brasileiro do meio ambiente - 11781 - 1/11-11-2007.

3.3. Peçonha de *B. moojeni*

A peçonha da serpente *Bothrops moojeni* foi adquirida do Serpentário Bioagents, em Batatais-SP, sob responsabilidade da bióloga Alexandra Jardim Sandrin. Após a coleta, a peçonha foi imediatamente dessecada a vácuo em temperatura ambiente e conservada a -20ºC até o momento do uso.

3.4. Isolamento da isoforma ácida de fosfolipase A_2 da peçonha bruta de *B. moojeni*

Um pool da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* (300 mg) foi dissolvida em 2,0 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH 8,0, centrifugada a 10.000*xg* por 10 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi aplicado a uma coluna (2 x 20 cm) contendo CM-Sepharose (Sigma Chem. Co.), sendo as amostras eluídas com um gradiente linear de concentração do mesmo tampão de 0,05 a 1,0 M. Frações de 3,0 mL/tubo foram coletadas num fluxo de 20 mL/h a temperatura ambiente em um coletor de frações GradFrac (Pharmacia Biotech), e lidas em espectrofotômetro *ThermoSpectronic* (Genesys).

A fração resultante da cromatografia de troca iônica com atividade fosfolipásica, denominada M-Ib, foi ressuspendida em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5 e 4 M de NaCl e aplicada em coluna (0,6 x 10 cm) contendo Phenyl-Sepharose (Sigma Chem. Co.), previamente preparada e equilibrada à temperatura ambiente com o mesmo tampão. As amostras foram coletadas a 3,0 mL/tubo, num fluxo de 20 mL/h, com gradiente decrescente de NaCl (4-0 M) em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,5 e, em seguida H_2O destilada. A absorbância de cada fração foi acompanhada em 280 nm em espectrofotômetro *ThermoSpectronic* (Genesys). Em seguida um gráfico foi construído, usando o programa *Originlab*, sendo as amostras delimitadas, reunidas em "pools", testadas para atividade fosfolipásica, liofilizadas e armazenadas a -20ºC até o momento do uso.

3.5. Caracterização Bioquímica da Fosfolipase A_2

3.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes

Foi realizada segundo metodologia descrita por Laemmli (1970), com modificações conforme descrito a seguir. O gel de separação de poliacrilamida a 12% (m/v) (bis-acrilamida: acrilamida 1:19, m/m) foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 8,8 e SDS 1%. O gel de empacotamento de poliacrilamida a 6% foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 0,1%. Amostras de proteína ou peçonha bruta foram dissolvidas em tampão fosfato em salina (PBS), acrescidas de 4 μL de tampão para amostras, Tris-HCl 0,5 M, pH 6,5 contendo azul de bromofenol (0,01%) e SDS (2%) e submetidas à fervura a 100°C por 4 minutos. As amostras da proteína ácida isolada foram preparadas na presença ou ausência de β-mercaptoetanol, que foi adicionado ao tampão de amostra a 3,5%.

Após a corrida eletroforética, realizada a 95 V e 15 mA, o gel foi corado por 10 minutos com *Coomassie brilliant blue* (G-250) 0,2% (p/v) dissolvido em água: metanol: ácido acético (40: 50: 10, v/v) e descorado em ácido acético 10%. O padrão de peso molecular utilizado (Sigma Chem Co.) é composto pelas seguintes proteínas: albumina bovina (66.000 Da), ovoalbumina (45.000 Da), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho (36.000 Da), anidrase carbônica bovina (29.000 Da), tripsinogênio de pâncreas bovino (24.000 Da), inibidor de tripsina de soja (20.100 Da) e α-lactalbumina de leite bovino (14.200 Da).

3.5.2. Focalização Isoelétrica

O ponto isoelétrico (p*I*) da proteína isolada foi determinado por focalização isoelétrica, segundo o método descrito por Vesterberg (1972) e realizado no laboratório da Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes, FCFRP-USP, Ribeirão Preto, SP. O gel foi preparado a 5% em poliacrilamida (bis-acrilamida: acrilamida 0,8:30), composto por 10% de sacarose, 1% (v/v) de buffalyte, 0,17% (v/v) de TEMED e 0,075% (m/v) de persulfato de amônio. A polimerização do gel foi realizada em placa de vidro de 12 x 14 cm com espessura de 0,14 cm. O gel foi colocado sobre uma placa refrigerada ligada a um banho a temperatura de 8°C. Cinco tiras de papel Whatman número 3 sobrepostas foram utilizadas para conectar o gel e os eletrodos, sendo o cátodo embebido em uma solução de NaOH 1 M e o ânodo em ácido fosfórico 1 M. A fonte de alta voltagem foi ajustada para valores de 100 V, 40 mA e então realizada uma pré-focalização por 30 minutos. Pedaços de papel da LKB de 1,0 x 0,5 cm foram embebidos nas amostras e colocados sobre o gel, sendo retirados após 30 minutos de focalização em 250 V e 40 mA. A focalização prosseguiu por mais 2 horas a 750V e 40 a 2mA, e por 1 hora e 20 minutos em 1500V e 5 a 0mA.

3.5.3. Análise da toxina isolada por cromatografia líquida de alta eficiência e SDS-PAGE

As frações obtidas foram analisadas quanto à pureza por SDS-PAGE e tiveram também avaliadas a sua atividade enzimática, sendo selecionada a fração de interesse. A fração contendo a proteína de interesse (Pico 7), foi liofilizada. Em seguida, 1 mg foi dissolvida em 500 µL de solução contendo 5% (v/v) acetonitrila e 1% (v/v) ácido trifluoracético (TFA), homogeneizada e centrifugada a 480xg por 2 minutos, sendo posteriormente submetida a uma cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna de fase reversa C-18 (2,0 x 250 mm) (GE Healthcare).

3.5.4. Espectrometria de massa

Frações de RP-HPLC liofilizadas contendo a proteína foram suspensas em TFA 0,1%. Volumes de 1 µL da amostra foram misturados a uma solução matriz de 2% de ácido α-ciano-4-hidroxi cinâmico contendo 70% (v/v) acetonitrila e 0,03% (v/v) TFA. A massa média da proteína foi obtida em sistema MALDI-TOF, modelo Microflex LRF MALDI-TOF (Bruker, Bremen, Alemanha), operado em modo linear usando os picos de tripsinogênio (23982Da) e ProteinA (22307 Da) para calibração externa. O algoritmo para detecção de picos utilizados foi centróide e os espectros de massa obtidos foram submetidos a uma subtração automática de linha de base. Experimento realizado pelo Prof. Dr. Saulo Luis da Silva (UFSJ).

3.5.5. Sequenciamento da região N-terminal

O sequenciamento N-terminal foi realizado por degradação de Edman, utilizando-se um sequenciador automático PPSQ-33A (Shimadzu) conforme metodologia previamente descrita (RODRIGUES et al., 2007). Os aminoácidos feniltioidantoina derivados (PTH-aminoácidos) foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos 20 PTH-aminoácidos padrão. A sequência obtida foi comparada com as sequências de outras proteínas relacionadas na base de dados SWISS-PROT/TREMBL usando o programa BLAST FASTA (http://blast.ncbi.nlm.nih. gov/ Blast.cgi) e outros programas. O sequenciamento foi realizado no laboratório da Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes, FCFRP-USP, Ribeirão Preto, SP.

3.5.6. Determinação quantitativa de proteínas

As dosagens de proteínas em soluções contendo 0,05 a 2,0 mg/mL foram realizadas pelo método do microbiureto, conforme descrito por Itzhaki e Gill (1964). A reta padrão foi construída utilizando soroalbumina bovina como proteína padrão.

3.6. Caracterização Funcional da Fosfolipase A_2

3.6.1. Modificação química da $BmooPLA_2$

Aproximadamente 3,0 mg da enzima, foram dissolvidos em 1,0 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,1 M, pH 8,0, 0,7 mM EDTA. Adicionaram-se 150 µL de uma solução de 0,8 mg/mL de brometo de p-bromofenacila (BPB) em etanol, incubando-se a temperatura ambiente por 24 horas (SOARES et al., 2000a). Após esta incubação, o excesso do reativo foi retirado utilizando um sistema de ultrafiltração (AMICON-YM3), através de sucessivas lavagens com tampão AMBIC 0,05 M, pH 8,0. A amostra de proteína modificada foi então liofilizada e submetida aos ensaios de hemólise indireta e atividade sobre a pressão arterial

3.6.2. Atividade hemolítica indireta

A atividade fosfolipásica foi testada pelo método de hemólise radial indireta, realizado em placas, como descrito por Gutiérrez et al. (1988), substituindo a agarose por ágar. O experimento consiste na elaboração de um gel ($CaCl_2$ 0,01 M; gema de ovo 1:3 v/v; PBS (solução salina tamponada em fosfato), pH 7,2; eritrócitos 1:3 (v/v) PBS; ágar bacteriológico 1%; azida de sódio 0,005%, sendo o volume final completado com PBS e o meio vertido em placas em temperatura de 45-50ºC. Após a solidificação do gel, foram feitos orifícios de tamanho uniforme (aproximadamente 0,5 cm de diâmetro) e aplicaram-se as amostras a um

volume final de 40 µL de peçonha ou PLA_2 diluídas em PBS com diferentes concentrações (0,05, 0,5, 1,5 e 3 µg).

Os géis contendo as amostras foram incubados em estufa a 37ºC por 12 horas. A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel foi um indicativo de atividade, sendo então os halos medidos em milímetros para a quantificação da atividade fosfolipásica. O sangue utilizado durante os testes foi imediatamente diluído em tampão PBS (30 mL) e as células lavadas 3 vezes, também com o tampão PBS, com centrifugações de 400*xg* por 10 minutos, para volumes aproximados de 10 mL de sangue. Após as centrifugações, o plasma foi desprezado e os eritrócitos utilizados na composição do gel.

A dose hemolítica indireta mínima (DheM) foi considerada como a quantidade de enzima (µg) responsável pela formação de um halo de aproximadamente 10 mm de diâmetro. Após a determinação da dose hemolítica indireta mínima, foram realizados ensaios de caracterização enzimática diversificando variáveis como pH e temperatura (Gutiérrez et al., 1988).

3.6.3. Atividade enzimática sobre lipídeos fluorescentes

Lipídios fluorescentes em pó [fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), ácido fosfatídico (PA) e fosfatidiletanolamina (PE)] foram reconstituídos em 100 µL de clorofórmio 100%, distribuídos em tubos de vidro e, em seguida, secos sobre um baixo fluxo de N_2. Os lipídios secos foram então dissolvidos em 150 mM de NaCl, sonicados quatro vezes a 4°C em intervalos de 1min até a obtenção de uma solução límpida. Uma solução estoque de lipídios de 1 mg/mL foi então preparada e utilizada nos testes. A atividade fosfolipásica da enzima foi avaliada por intensidade de fluorescência, utilizando-se como substrato acil-NBD. Os testes foram realizados com um volume final de 3,0 mL em espectrômetro de fluorescência (Hitachi F450) a temperatura ambiente.

A excitação e emissão de comprimento de onda foram ajustadas para 460 nm e 543 nm, respectivamente. A reação padrão continha Tris-HCl 50 mM, $CaCl_2$ 1 mM, pH 7,5. Uma leitura prévia no tempo de 2 min foi realizada com todos os componentes exceto com a enzima. A atividade enzimática foi então iniciada através da adição da PLA_2 ácida e uma segunda leitura, após 12 min, foi realizada. Para corrigir traços de contaminações indesejáveis nas amostras, o tempo inicial de leitura foi subtraído da leitura da amostra contendo a PLA_2 antes da análise dos resultados. Quando necessário, a mudança ocorrida na intensidade da fluorescência foi convertida para nmoles de produto por minuto (nmoles/min) utilizando uma curva de calibração, preparada hidrolisando-se completamente uma solução de substrato através do tratamento com hidróxido de sódio (RODRIGUES et al., 2007). Esta atividade foi

realizada em colaboração com o Prof. Dr. André L. Fuly, Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói, RJ.

3.6.4. Indução de edema

Grupos de 5 camundongos *Swiss* machos (18-22 g) foram injetados, via intradérmica (i.d) na região subplantar da pata direita, com 50 µL de soluções contendo 25 µg da PLA_2 dissolvida em PBS. A determinação da espessura das patas foi realizada antes da inoculação das amostras (tempo 0h), e em seguida à injeção das amostras. Foi realizada a mensuração das patas em diferentes intervalos de tempo (30min, 1h e 3h). Os valores inicialmente obtidos no tempo 0h foram subtraídos aos valores obtidos nos diferentes tempos após as injeções. O aumento da área da pata dos camundongos foi medido com um paquímetro de baixa pressão 0,01 mm (Mytutoyo, Japão) e expresso em porcentagem direta de edema induzido (SOARES et al., 2000a).

3.6.5. Efeitos sobre plaquetas

Plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado a partir de sangue de coelho citratado, centrifugado (380*xg*/12 min) a temperatura ambiente. A agregação plaquetária foi medida turbidimetricamente usando um agregômetro (*Chrono-Log Corporation*). Os ensaios foram feitos a 37°C usando 200 µL de PRP e após pré-incubação de 2 min com diferentes concentrações da enzima na presença de cálcio (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; FULY et al., 2004). Para a realização dos experimentos, foram adicionados os indutores de agregação plaquetária ADP e colágeno. Este experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. André L. Fuly, Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói, RJ.

3.6.6. Atividade Hipotensora

Um sistema de monitoramento de pressão não-invasivo (*CODA®, Kent Scientific Corporation*) foi utilizado para avaliar a atividade hipotensora de $BmooPLA_2$ nativa e recombinante em grupos de cinco camundongos (18-20 g). A pressão sanguínea foi determinada antes (tempo 0) e após 5, 10, 15 e 20 min da injeção intravenosa de 15 e 30 µg da enzima nativa, recombinante e modificada com BPB, dissolvidas em 100 µL de PBS. Um grupo controle negativo recebeu apenas 100 µL de PBS. Este experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Bruno Lomonte, Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, UCR, San José, Costa Rica.

3.6.7. Atividade miotóxica

Grupos de 6 camundongos machos *Swiss* (18-22 g) foram injetados via intramuscular (i.m) no músculo gastrocnêmio direito com 100 µg da proteína isolada, dissolvidos em 50 µL de PBS. Os controles negativos receberam somente PBS. Três horas depois, o sangue dos camundongos foi coletado, por pequeno corte na extremidade da cauda, em capilares heparinizados e imediatamente centrifugados por 20 min a 1.530*xg*. A atividade da enzima creatina cinase foi determinada utilizando-se 4 µL de plasma incubados com 1,0 mL de reativo do kit CK-NAC cinético (Bioclin) dissolvido em água destilada, por 3 min a 37ºC, através de leituras em espectrofotômetro a 340 nm. A variação em absorbância é diretamente proporcional à atividade da enzima creatina cinase. A atividade foi expressa em unidades/litro. Uma unidade consiste no resultado da fosforilação de um nanomol (nmol) de creatina por minuto (SOARES et al., 2000a).

3.6.8. Atividade anticoagulante

A atividade anticoagulante foi realizada de acordo com o método previamente descrito (ALVARADO e GUTIÉRREZ, 1988), utilizando plasma humano citratado. A enzima (25 µg) foi previamente incubada com 200 µL de plasma citratado, por 1 a 10 min, a 37ºC. Posteriormente, foram adicionados 25 µL de solução de cloreto de cálcio (0,25mM) e cronometrado o tempo de coagulação em minutos. O valor foi calculado com base na quantidade mínima de enzima capaz de tornar o plasma incoagulável (dose anticoagulante mínima), considerando o tempo máximo de 45 minutos para tal classificação. Os controles foram realizados adicionando-se 25 µL de solução de cloreto de cálcio (0,25 mM) a 200 µL de plasma citratado.

Para a realização do teste foi utilizado plasma humano cedido pelo Hemocentro de Ribeirão Preto-SP.

3.6.9. Efeitos *in vitro* das fosfolipases A_2 sobre a expressão de mediadores inflamatórios por macrófagos peritoneais

Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos: Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal, 96 horas após a injeção i.p. de 1,0 mL de solução estéril de tioglicolato a 4%. Para a coleta de células, os animais foram sacrificados por exposição à atmosfera de CO_2, e a cavidade peritoneal lavada com 2 mL de salina (PBS) /10 UI/mL de heparina. O lavado peritoneal foi centrifugado (200*xg* 6 minutos) e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas por 2 vezes com solução fisiológica apirogênica e

ressuspendidas em meio de cultura RPMI. A seguir, foi feita a contagem total das células e o volume foi ajustado de acordo com a necessidade de cada ensaio.

Ensaio para a determinação da viabilidade celular - Análise da liberação da lactato desidrogenase (LDH): A atividade enzimática da LDH, presente no meio de cultura, foi tomada como parâmetro da viabilidade celular. Para tanto, $2x10^5$ células/poço foram aderidas em micro placas de 96 poços e incubadas com as PLA_2s, nas concentrações de 6,3; e 12,6 mg/mL ou TRITON X-100 0,1% (controle positivo), diluídos em meio de cultura RPMI ou meio de cultura RPMI somente (controle negativo), por 6 e 24 horas. Após este período de tempo, o sobrenadante foi retirado e centrifugado a 200 *xg* por 10 min e 30 µL do sobrenadante foram adicionados a outra micro placa de cultura de 96 poços, acompanhados da adição de 170 µL do substrato, em tampão fosfato, contendo: NaCl 200 mM, NADH 0,2 mM, piruvato 1,6 mM/poco. A seguir, foi realizada a leitura da densidade óptica (D.O.) a 340 nm no intervalo de tempo de 0 e 10 minutos. Os resultados foram extrapolados pelo decréscimo da D.O. resultante da oxidação do NADH, na presença de piruvato, em relação ao tempo zero e expressos em mmoles de NADH/minuto.

Análise da expressão protéica de COX-2 por Western blot: Para análise da expressão protéica de COXs, $1x10^6$ macrófagos foram colocados para aderir em placas de cultura de fundo chato de 24 poços por 20 minutos. A seguir, os poços foram lavados com salina e os macrófagos aderidos foram incubados com as enzimas nativa e recombinante, em períodos de 1, 3, 6 e 24 h. Ao final de cada período de incubação, o precipitado celular foi utilizado para análise da expressão protéica de ciclooxigenases.

Os macrófagos aderidos foram lisados com 100 µL de tampão de amostra (LAEMMLI, 1970) (SDS 20%; glicerina; β-mercaptoetanol 1M; tampão Tris 0,5 M pH 6,8; 21 Azul de bromofenol a 0,1%) e fervidas a 100°C por 10 minutos. As proteínas contidas em quantidades de 15 µL de amostra foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE). Para tanto, foi aplicada uma voltagem constante de 150 V. Posteriormente, as bandas protéicas foram transferidas, em sistema tamponado, para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare), com uma voltagem de 100 V, durante 90 minutos, a 4°C.

Os sítios inespecíficos, da membrana de nitrocelulose, foram bloqueados por uma solução contendo leite desnatado a 5% em TTBS/ 10% Tween-20, pH 7,4, durante 1 hora. Para a detecção de COX-2, as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-COX-2 (Cayman) (1:2000 v/v) durante 1 hora. Em seguida, foi adicionado um segundo anticorpo, conjugado a peroxidase, para a detecção de COX-2 (anti-IgG de camundongo (anti-IgG de coelho (*GE Healthcare*), 1:2000 v/v), durante 1 hora. Para o controle do western blot as membranas foram

incubadas também com anticorpo monoclonal anti-β-actina (Sigma) na diluição de 1:2000 (v/v), e anticorpo anti-IgG de camundongo (*GE Healthcare*) na diluição de 1:2000.

As bandas imunorreativas para a isoforma de COX-2 foram reveladas por quimiluminescência, com solução de luminol (*GE Healthcare*), e em seguida, reveladas em filme (*GE Heathcare*) em câmara escura. A intensidade das bandas foi determinada por densitometria (*Bio Rad Laboratories*).

Purificação e quantificação de eicosanóides: As concentrações de LTB_4, TXB_2 e de PGE_2 foram determinadas através de ensaio imunoenzimático especifico (PRADELLES et al., 1985), a partir do sobrenadante dos lavados peritoneais coletados. Depois da adição do substrato colorimétrico, as absorbâncias foram lidas a 412 nm em micro leitor e a concentração de eicosanóides estimada por uma curva padrão.

3.7. Caracterização Molecular da Fosfolipase A_2

3.7.1. Construção da biblioteca de cDNA da serpente *B. moojeni* e seleção do gene de interesse

Um exemplar da serpente *B. moojeni* foi cedido pelo Biotério Geral da Faculdade de Medicina de Ribierão Preto e sacrificado por decapitação. As glândulas de peçonha foram retiradas 3 dias após extração da peçonha, quando o processo de transcrição está estimulado. Após retirados, o par de glândulas foi imediatamente homogeneizado em nitrogênio líquido e o RNA total (RNAt) foi extraído pelo método do TrizolTM LS (Invitrogen) (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009). O RNA poli A+ (RNAm) foi purificado por meio do kit *PolyATtract*® (Promega) de acordo com as especificações do frabicante e 3 µg desse RNAm foi utilizado para a construção da biblioteca de cDNA, utilizando-se o kit *CloneMiner*™ *cDNA Library Construction* (Invitrogen). A primeira e segunda fita do cDNA foram sintetizadas de acordo com as especificações do fabricante e o fracionamento do cDNA foi realizado por exclusão em 1 mL de resina Sephacryl S-500 (Invitrogen). As frações eluidas foram agrupadas até que 300 ng de cDNA fossem obtidos. 100 ng de cDNA foram utilizados para construção do plasmídio direcional e um total de $6{,}9 \times 10^6$ CFU/mL foram obtidos. As colônias foram plaqueadas e as culturas permanentes foram, em seguida, preparadas em placas de 96 poços e incubadas overnight em meio LB (50 µg/mL de kanamicina), para então realizar a extração do DNA por lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). Depois da quantificação, 300 ng de DNA, correspondente a uma única colônia, foi utilizado como molde para a reação de sequenciamento, utilizando o kit DYEnamic ET Dye Terminator (GE

Healthcare, UK) e primer universal M13 forward, de acordo com as especificações do fabricante. Os produtos amplificados foram sequenciados em sequenciador automático MEGA-BACE 1000 (GE Healthcare, UK). Estes experimentos foram desenvolvidos no laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos sob a responsabilidade do Prof. Dr. Flávio Henrique Silva.

3.7.2. Expressão da fosfolipase A_2 recombinante

A busca de sequências de cDNAs que codifiquem para PLA_2s ácidas dentro do banco foi prioritária, e uma vez identificados e selecionados a clonagem completa de seu cDNA foi realizada. Esta clonagem foi realizada com a utilização do kit Topo (contendo plasmídeos cortados nos sítios de *BamHI* e *NdeI*, prontos para receber o inserto de cDNA), para a construção do vetor recombinante e sua inserção em bactérias competentes. As colônias de bactérias recombinantes analisadas que obtiveram o cDNA da PLA_2 ácida de interesse foram utilizadas no sequenciamento automatizado. Os oligonucleotídeos (*primers*) foram desenhados de forma que, após a amplificação, a sequência do cDNA contivesse nas suas extremidades 5' e 3' os sítios de restrição para as enzimas *Nde-I* e *BamH-I*, respectivamente (PLA-1: 5' cgcatatgagcctgtggcaattcgggaag 3' e PLA-2: 5' gcggatccttagcatggctctgacttctcc 3').

A expressão e a purificação da enzima recombinante foi realizada seguindo protocolos experimentais previamente descritos (WARD et al., 2001; ROBERTO et al., 2004), com algumas modificações. Os estudos de expressão foram realizados com células *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS transformadas com os plasmídeos recombinantes derivados do vetor pET-21a. A expressão inicial foi realizada inoculando-se uma colônia dos clones em 50 mL de meio de cultura LB líquido contendo cloranfenicol e ampicilina (50 µg/mL), sob agitação a 37ºC, sendo a proliferação monitorada pela medida da absorbância a 600 nm. Quando a cultura atingiu de 0,8-1,0 UAbs foi adicionado o IPTG na concentração de 1 mM. Controles não induzidos por IPTG foram realizados nas mesmas condições experimentais descritas anteriormente.

Após o tempo de indução, 1 mL do meio de cultura foi centrifugado (6.000*xg* por 5 min a temperatura ambiente) e o sedimento lavado com solução contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,8, EDTA 10 mM, uréia 0,5 M e Triton X-100 0,5%. O sedimento contendo os corpos de inclusão foi ressuspenso em 150 µL de água MilliQ estéril e 15 µL deste foi analisado em SDS-PAGE a 12% como previamente descrito no item 3.5.1. O restante do meio de cultura foi centrifugado por 30 min a 6.000*xg* e as células contendo os corpos de inclusão foram armazenadas a -80ºC.

3.7.3. Purificação e redobramento da proteína recombinante

Extração e purificação da PLA_2 dos corpos de inclusão: Os sedimentos de células induzidas contendo a proteína recombinante foram submetidos a duas etapas de sonicação em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,8, contendo EDTA 10 mM, uréia 0,5 M e Triton X-100 0,5%, seguida de centrifugação (4.500*xg* por 15 min). O homogenato foi distribuído em tubos de 2 mL, submetidos novamente à centrifugação (4.000 *xg* por 5 min) e o sedimento tratado com 1,5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,8 contendo 3 M de uréia por 30 min a 37°C. As amostras foram centrifugadas a 20.000 *xg* por 5 min, e o sedimento ressuspenso em 500 µL do tampão de modificação (contendo 300 µL de dissódio-2-nitro-5(tiossulfo)-benzoato + tiocianato de guanidina), incubado por 1 h à temperatura ambiente. A amostra foi aplicada em uma coluna (1,5 x 3 cm) de exclusão molecular BioGel P6 (BioRad), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, sendo a eluição realizada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,8 + 2M de hidrocloreto de guanidina (WARD et al., 2001; ROBERTO et al., 2004). O monitoramento foi realizado pela absorbância em 280 nm e as frações foram coletadas e reunidas para o redobramento da proteína recombinante de interesse.

Redobramento e Purificação da PLA_2 recombinante: O redobramento da recBmooPLA$_2$ foi realizado na mesma coluna de BioGel P6 anteriormente descrita, equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,8, contendo 0,3 M de hidrocloreto de guanidina, 6 mM de cisteína e 3 mM de cistina. Após aplicação da amostra de interesse, a coluna foi mantida por aproximadamente 16 h à temperatura ambiente e, em seguida, a proteína foi eluída com 10 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,8 contendo 0,3 M de hidrocloreto de guanidina. As amostras coletadas foram diluídas em 5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,8, contendo 0,3 M de hidrocloreto de guanidina, 6 mM de cisteína e 3 mM de cistina e mantidas à temperatura ambiente com agitação moderada durante 48 h para permitir a renaturação da proteína de interesse. Finalmente, a amostra foi aplicada em coluna de fase reversa C18 (4,6 x 250 mm) em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu), equipado com detector UV, previamente equilibrada com 10% da solução B (0,09% de TFA em 80% de acetonitrila) e 90% da solução A (0,1% de TFA), em fluxo de 1,0 mL/minuto. Os picos coletados foram concentrados e secos a vácuo. O perfil cromatográfico da enzima nativa, BmooPLA$_2$, isolada diretamente do peçonha de *B. moojeni*, foi obtido nas mesmas condições experimentais e utilizado como padrão de comparação com a proteína recombinante (WARD et al., 2001; ROBERTO et al., 2004). Todos os experimentos de expressão da proteína recombinante foram realizados pelo laboratório do Prof. Dr. Saulo Luis da Silva (UFSJ).

3.8. Caracterização Estrutural da Fosfolipase A_2

3.8.1. Alinhamento múltiplo

O alinhamento múltiplo foi realizado entre a sequência da $BmooPLA_2$ e das outras moléculas homólogas depositadas no banco de dados estrutural [NCBI BLAST / FASTA: (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)], ultizando o programa Clustal W1.8.

3.8.2. Modelagem molecular

A sequência de aminoácidos deduzida a partir do cDNA da $BmooPLA_2$ foi modelada pela comparação com a estrutura cristalográfica da BthA-I-PLA_2 ácida de *Bothrops jararacussu* (MAGRO et al., 2004; 2005), e apresentada na forma RIBBON.

A figura de representação esquemática do modelo protéico construído por homologia foi gerada pelo programa PyMol (DELANO, 2002), enquanto que a figura do diagrama de Ramachandran foi gerada pelo programa PROCHECK (LASKOWSKI, 1993). A modelagem foi realizada pela Prof. Dra. Daniela Priscila Marchi Salvador, da Universidade Federal da Paraíba.

3.8.3. Cristalografia

Os estudos parciais de cristalização foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Marcos Roberto M. Fontes (UNESP-Botucatu-SP), utilizando o método de Difusão de Vapor, sistema "hanging drop". Nessa técnica, uma gota de 2 a 10 μL da amostra de enzima foi misturada com o mesmo volume da solução de cristalização (geralmente tampão, sal e precipitante) e colocada em uma lamínula siliconizada. A lamínula foi então invertida e selada com graxa de silicone sob um reservatório contendo de 500 a 1000 μL de solução de cristalização. A diferença de concentração entre a gota e o reservatório fez com que o sistema atingisse o equilíbrio por difusão, levando a formação de cristais (BERGFORS, 1999).

3.9. Análise dos resultados

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, sendo expressos os resultados pela média +/- desvio padrão (SD). A análise estatística foi realizada por ANOVA e/ou teste t-estudant e os níveis de significância considerados dentro do intervalo de confiança $0,1 < p < 0,05$, utilizando o *software* Prism GraphPad (GraphPad Software, USA)

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e caracterização bioquímica da PLA_2 ácida isolada da peçonha de *B. moojeni*

A peçonha total da serpente *Bothrops moojeni*, submetida à cromatografia de troca iônica em resina de CM-Sepharose, resultou em dez frações, designadas M-Ia, M-Ib, M-IIa, M-IIb, M-III, M-IV, M-V, M-VI, M-VII e M-VIII (Fig. 3A). O pico M-Ib (Fig. 3B) liofilizado, correspondente a fração ácida com maior atividade fosfolipásica, foi submetido à cromatografia de hidrofobicidade em resina Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (Fig. 3C), obtendo-se a fosfolipase A_2 ácida na fração eluida com água, que foi denominada de $BmooPLA_2$. A $BmooPLA_2$ isolada, apresentou alto grau de pureza em focalização isolelétrica, SDS-PAGE (Fig. 4A) e espectrometria de massa (Fig. 4B), demonstrando uma massa molar de 13.601 Da e ponto isoelétrico de aproximadamente 5,2 (Fig. 4C).

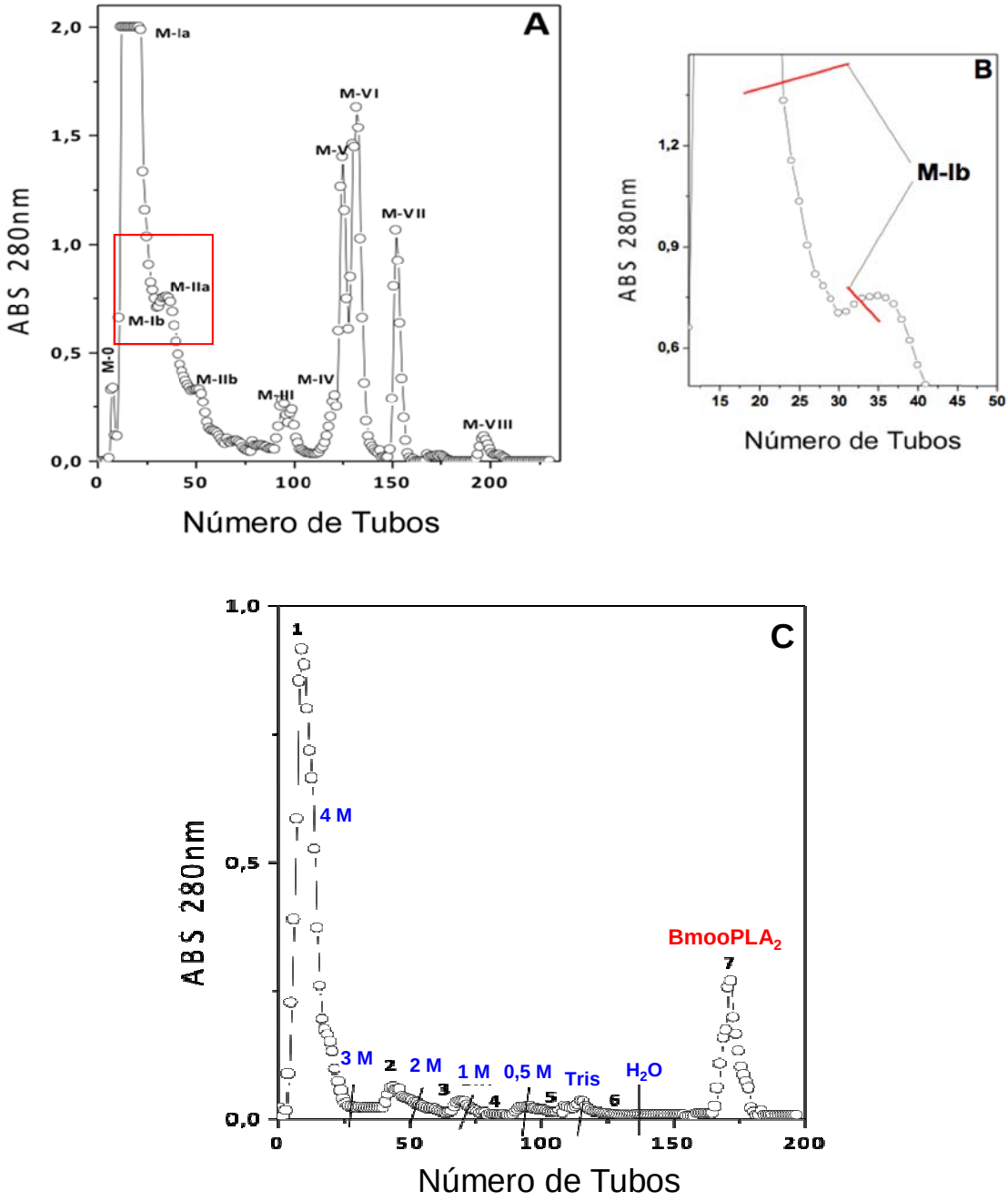


Figura 3. Isolamento da PLA_2 ácida da peçonha de *B. moojeni*. **(A)** Fracionamento de 300 mg da peçonha de *B. moojeni* em cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose equilibrada em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 8,0 eluída com gradiente linear de concentração do tampão até 1,0 M, à temperatura ambiente. **(B)** Ampliação da região selecionada da cromatografia em CM Sepharose. **(C)** Fracionamento da fração M-Ib (60 mg) em cromatografia hidrofóbica em Phenyl-Sepharose equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, contendo 4 M de NaCl, eluída com gradiente inverso de concentração de NaCl (4 a 0 M), seguida de eluição com água.

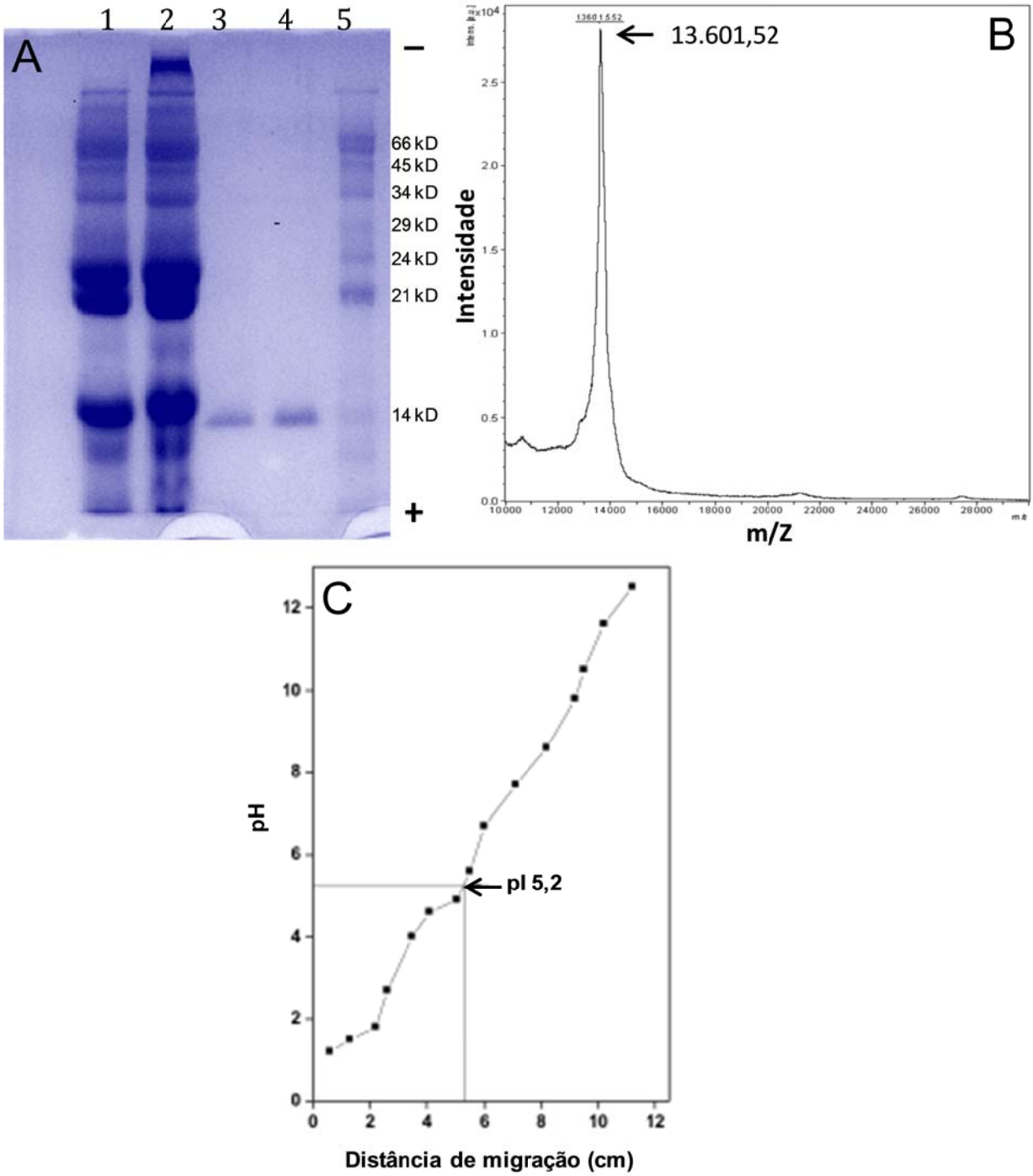


Figura 4. Caracterização bioquímica da PLA_2 ácida de *B. moojeni* **(A)** SDS-PAGE a 12% na presença e ausência de agentes redutores, sendo **(1)** peçonha de *Bothrops moojeni* (30µg) na presença de agente redutor **(2)** peçonha de *B. moojeni* (30µg) sem agente redutor; **(3)** $BmooPLA_2$ (10µg) na presença de agente redutor; **(4)** $BmooPLA_2$ (10µg) sem agente redutor; **(5)** Padrão de peso molecular 14, 21, 24, 29, 34, 45 e 66kDa. **(B)** Espectrometria de massa da $BmooPLA_2$ (massa molar de 13.601 Da); **(C)** Focalização Isoelétrica da $BmooPLA_2$.

A atividade fosfolipásica foi testada pelo método de hemólise radial indireta (Fig. 5A), demonstrando que a enzima $BmooPLA_2$ possui uma DHeM de 1,0 ± 0,2 µg. Para os demais testes de avaliação da atividade em função da temperatura e pH foi utilizado 1DHeM, nos quais a enzima demonstrou pH e termo-estabilidade, mesmo em condições extremas (Fig. 5B e 5C). Foi considerado como 100% a atividade fosfolipásica da peçonha bruta.

A Tabela 1 mostra algumas das atividades da $BmooPLA_2$ (25 µg) onde a mesma foi capaz de induzir 68% de edema. Resultado similar ao obtido com a enzima ácida BthA-I-PLA_2 (63%) e diferente do edema induzido pela PLA_2 básica BthTX-II (93,8%), ambas isoladas da peçonha de *Bothrops jararacussu*. A $BmooPLA_2$ não apresentou atividade miotóxica, diferentemente da PLA_2 básica que demonstrou alta miotoxicidade.

Tabela 1. Atividades farmacológicas induzidas pelas isoformas de PLA_2s isoladas das peçonhas de *B. moojeni* e *B. jararacussu*.

Enzimas	*Atividade Anti-coagulante* [a] *(µg/200µL plasma)*	*Edema* [b] *(%)*	*Atividade Miotóxica* [c] *(U/L)*
$BmooPLA_2$	0.18	68.0	418,4 ± 35,8
BthA-I-PLA_2	0.18	63.0	419,2 ± 30,9
BthTX-II	0.06	93.8	3.210,8 ± 265,6
PBS	-	9.5	406,0 ± 25,6

[a] Expressa a quantidade de enzima capaz de tornar o plasma incoagulável (> 45min); [b] Expressa o aumento da área da pata do camundongo injetada com 25 µg de enzima após 30 min.; [c] Determinada pela dosagem de CK no plasma de camundongos injetados com 100 µg de enzima.

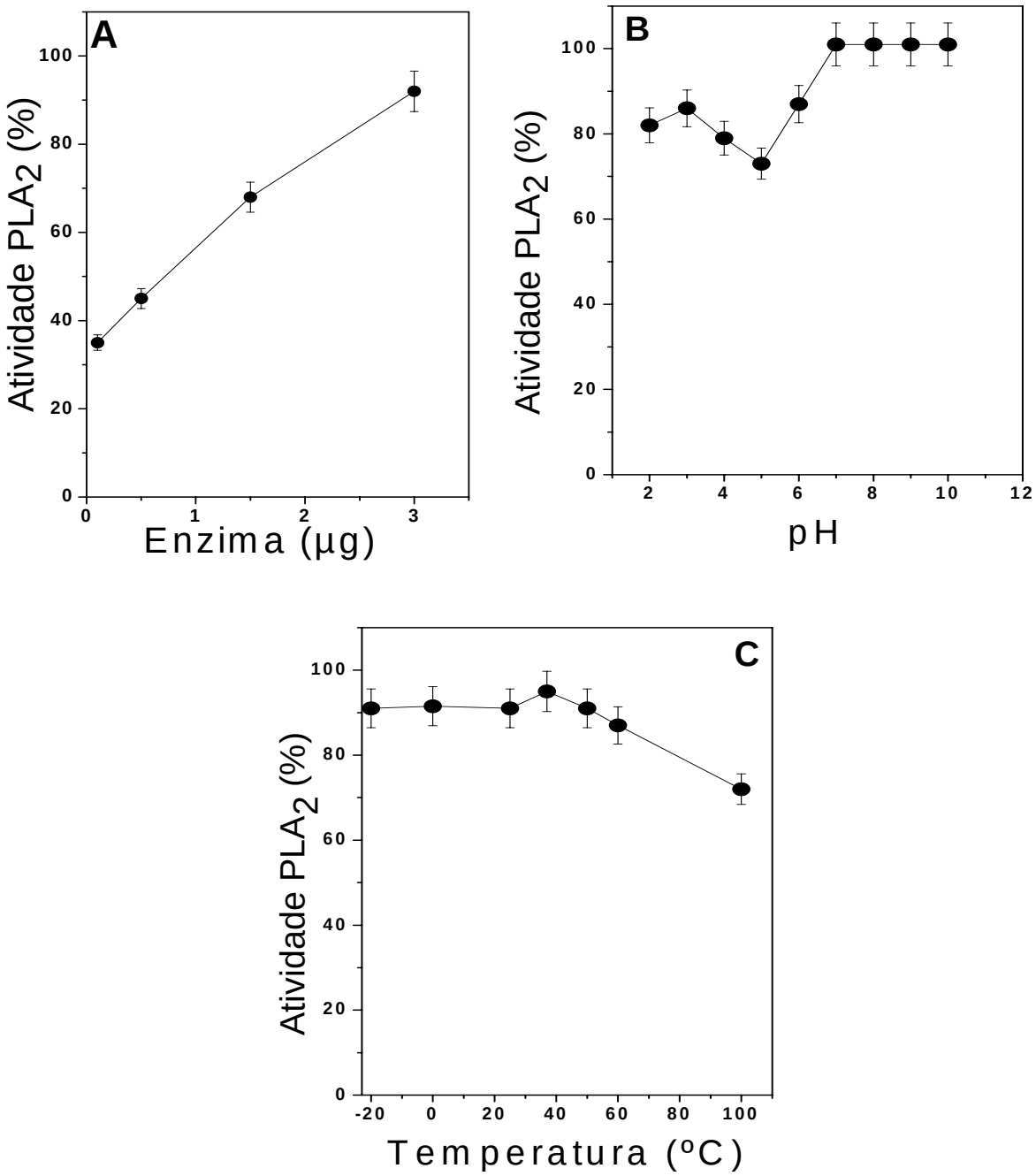


Figura 5. Caracterização enzimática da fosfolipase A_2 ácida isolada de peçonha de serpente *B. moojeni*. A atividade fosfolipásica foi avaliada pelo método de hemólise radial indireta. Os géis contendo as amostras foram mantidos em estufa a 37ºC por 12 horas. Os halos foram medidos em centímetros para a quantificação da atividade fosfolipásica. **(A)** Atividade fosfolipásica; **(B)** Atividade fosfolipásica em diferentes pHs; **(C)** Atividade fosfolipásica em diferentes temperaturas. Resultados expressos pela média ± SD (n=3). Para o gráfico **A**, 100% de atividade PLA_2 foi considerado como a DHeM da peçonha bruta de *B. moojeni*, Para os gráficos **B** e **C** 100% de atividade PLA_2 foi considerado como a atividade da DHeM da $BmooPLA_2$.

Os resíduos de aminoácidos da região N-terminal da BmooPLA$_2$ foram sequenciados e então comparados com a mesma região protéica de outras fosfolipases A$_2$ ácidas de peçonhas de serpentes (Fig. 6). As sequências N-terminal das PLA$_2$s analisadas foram obtidas do banco de dados do *NCBI,* de proteínas com sequências previamente determinadas e depositadas, e mostraram similaridade com a BmooPLA$_2$.

```
BmooPLA2                                NLWQFEMLIMKIAKTSGFLFYSSYGCYCGWGGHG
BinTX-I (Bothrops insularis)            NLWQFGKMMNYVMGQSVVYKYFYYGCYCGWGGIG
BJ-PLA2 (Bothrops jararaca)             DLWQFGQMMNDVMREYVVFNYLYYGCYCGWGGIG
BthTX-II (Bothrops jararacussu)         SLWQFGKMINYVMGESGVLQYLSYGCYCGLGGQG
BthA-I-PLA2 (Bothrops jararacussu)      SLWQFGKMINYVMGESGVLQYLSYGCYCGLGGQG
BE-I-PLA2(Bothrops erythromelas)        SLVQFETLIMKIAGRSGVWYYGSYGCYCGSGGQG
Bothrops pictus PLA2                    SLVQFETLIMKIAKRSGVWFYGSYGCFCGSGGQG
Agkistrodon h. pallas acidic PLA2       SLVQFETLIMKVAKKSGMQWYSNYGCYCGWGGQG
Crotalus v. viridis acidic PLA2         NLVQFELLIMKVAKRSGLLSYSAYGCYCGWGGHG
Daboia r. siamensis acidic PLA2         NLYQFGEMINQKTGNFGLLSYVYYGCYCGWGGKG
PrTX-III (Bothrops pirajai)             DLWQFGKMILKETGKLPFPYYVTYGCYCGVGGRG
                                        .* **  ::        .  *  ***:** ** *
```

Figura 6. Alinhamento da região N-terminal de BmooPLA$_2$ com outras fosfolipases A$_2$ de peçonhas de serpentes. BthTX-II básica (*Bothrops jararacussu*, gi 37928232), BinTX-I acídica (*Bothrops insularis*, gi 26006832), BE-I-PLA$_2$ acídica (*Bothrops erythromelas*, gi 86450426), PLA$_2$ acídica (*Bothrops pictus*, gi 23396779), PLA$_2$ acídica (*Agkistrodon halys pallas*, gi 28948589), PLA$_2$ acídica (*Crotalus v. viridis*, gi 28893822), PLA$_2$ acídica (*Daboia russellii siamensis*, gi 71912209), BJ-PLA$_2$ acídica (*Bothrops jararaca*, gi 3914258), BthA-I-PLA$_2$ acídica (*Bothrops jararacussu*, gi 25140377) e PrTX-III básica (*Bothrops pirajai*, gi 16974919). O alinhamento foi realizado utilizando o programa *Clustal W 1.8*. Os resíduos idênticos estão marcados com um "*".

A $BmooPLA_2$ apresentou atividade inibitória dose-dependente sobre a agregação plaquetária em ambos os experimentos, utilizando como indutores de agregação o ADP e o colágeno (Fig. 7A). Quando injetada intra-venosamente, a $BmooPLA_2$ causou uma imediata diminuição na pressão sanguínea (Fig. 7B), sendo o efeito mais intenso observado nos primeiros 5 min após a injeção, tanto para a menor quanto para a maior dose testada. O efeito hipotensor foi completamente abolido após incubação da toxina com BPB (Fig. 7B).

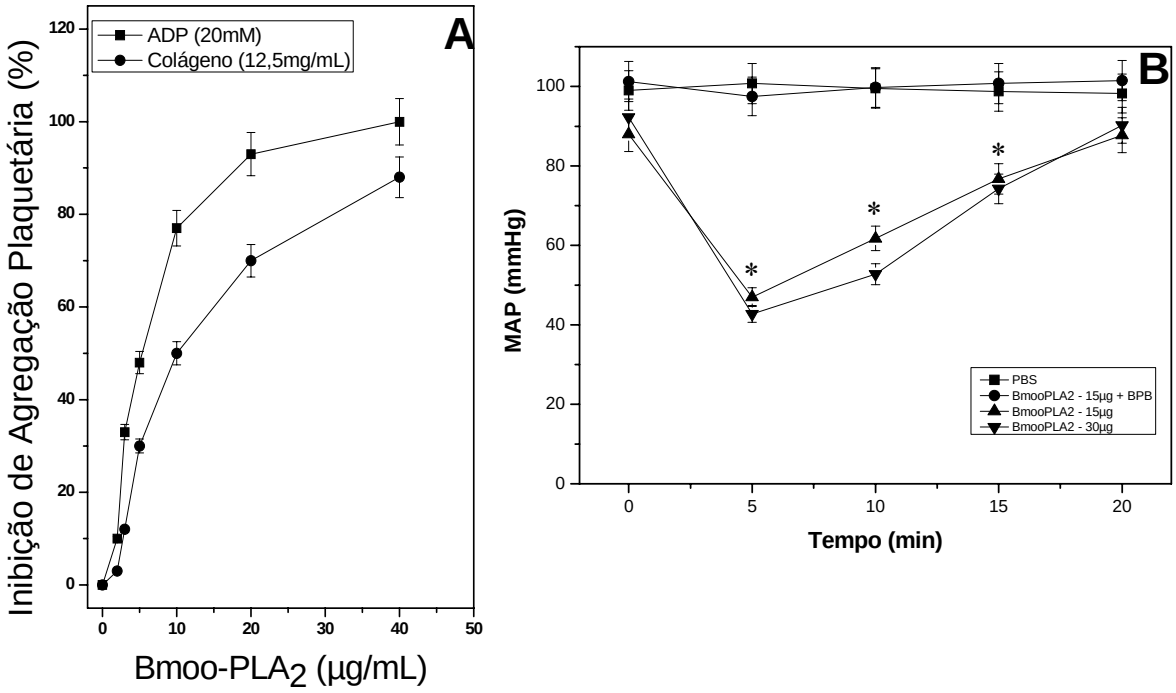


Figura 7. Inibição de agregação plaquetária e efeito hipotensor da $BmooPLA_2$ **(A)** Inibição de agregação plaquetária induzida pela $BmooPLA_2$ isolada de *Bothrops moojeni* na presença de ADP (○) ou colágeno (●)**.** A atividade da enzima foi avaliada sobre plasma rico em plaquetas (PRP). O efeito inibitório da PLA_2 na agregação plaquetária foi expresso como a diferença em percentual da resposta máxima obtida na presença da PLA_2, em comparação com o valor obtido no controle. **(B)** Efeito hipotensor da $BmooPLA_2$ e efeito da modificação química da toxina com BPB. A pressão arterial média de ratos foi registradas antes (0 min) e depois (5, 10, 15 e 20 min) da injeção (i.v.) da enzima (15 e 30 µg) ou PBS, em condições idênticas. Resultados expressos pela média ± SD (n=5), * $P < 0,05$.

4.2. Construção da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha da serpente *Bothrops moojeni* e expressão da enzima recombinante

Foram obtidas 394 ESTs adequadas para análise. Essas sequências foram então clusterizadas e classificadas utilizando o software dCAS (GUO et al., 2009). De um total de 360 clusters, 23 foram identificados como toxinas, sendo os demais, identificados como proteínas celulares ou desconhecidas. Os clusters foram agrupados de acordo com o tipo de proteína: metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A_2, fatores de crescimento, peptídeos potenciadores de bradicinina, L-aminoácido oxidases (LAAO) e lectina tipo C.

A figura 8 mostra a porcentagem de cada grupo de toxina com relação ao número total de sequencias obtidas. As metaloproteases foram as toxinas mais abundantes encontradas na biblioteca, perfazendo um total de 77%. Os peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP) correponderam a 9%, seguidos das serinoproteases, com 7%; LAAOs, com 3%, PLA_2s, 2% e Lectinas tipo C e fator de crescimento vascular, ambos com 1%.

A sequência completa do cDNA da PLA_2 ácida de *B. moojeni* contendo 414 pares de bases codifica para uma proteína madura de 138 aminoácidos (Fig. 9).

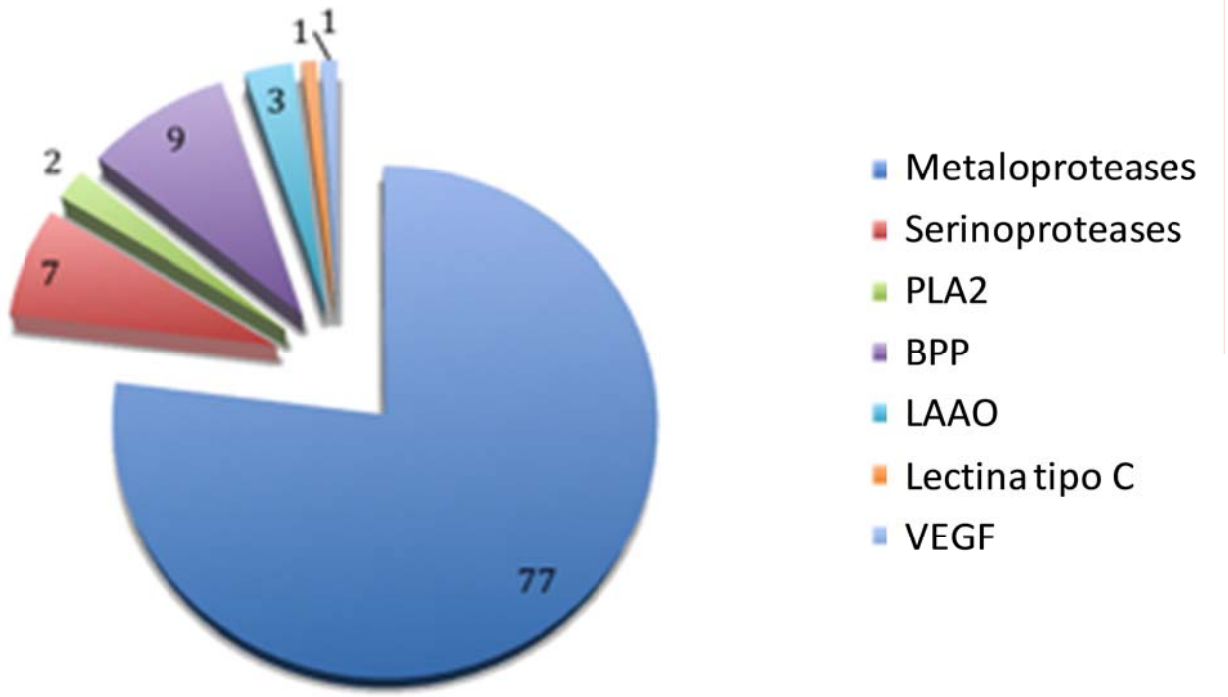


Figura 8. Análise da Biblioteca de cDNA da glândula de peçonha da serpente *Bothrops moojeni*. Proporções relativas de cada grupo de toxinas. Resultados expressos em %.

```
atgagaacgttatggatcgttgctgtcctactcttgggggtggaaggaaacctttggcag
 M  R  T  L  W  I  V  A  V  L  L  L  G  V  E  G  N  L  W  Q
tttgaaatgttaataatgaagatagccaagacgagtggattcctgttttacagctcttac
 F  E  M  L  I  M  K  I  A  K  T  S  G  F  L  F  Y  S  S  Y
ggctgttactgcgggtgggggggacacggtaggccacaagatgcaactgatcggtgttgc
 G  C  Y  C  G  W  G  G  H  G  R  P  Q  D  A  T  D  R  C  C
tttgtgcatgactgttgctatggtaaagtaaccggatgcaatcctaagaccgactcgtat
 F  V  H  D  C  C  Y  G  K  V  T  G  C  N  P  K  T  D  S  Y
acttattccgaggaaaacggcgatgtcgtatgcggtggcgatgacccctgtaagaaacag
 T  Y  S  E  E  N  G  D  V  V  C  G  G  D  D  P  C  K  K  Q
atttgtgagtgtgatcgtgttgctgcaacatgcttccgagacaataaagacacatatgat
 I  C  E  C  D  R  V  A  A  T  C  F  R  D  N  K  D  T  Y  D
aataaatattggttctacccagcgaaaaactgccaagaagagtcagagccgtgt
 N  K  Y  W  F  Y  P  A  K  N  C  Q  E  E  S  E  P  C
```

Figura 9. Sequência completa do cDNA que codifica para a BmooPLA$_2$. A região sublinhada corresponde à região N-terminal da proteína madura. A região inicial corresponde ao peptídeo sinal.

A expressão da recBmooPLA$_2$ foi eficiente, como demonstrado pela SDS-PAGE, após indução por IPTG (Fig. 10A). A purificação de BmooPLA$_2$ recombinante foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (RP-HPLC), demonstrando um perfil cromatográfico e eletroforético similiar ao da proteína nativa (Fig. 10B e 10C).

Para constatar a funcionalidade da enzima recombinante, algumas atividades foram realizadas. No teste de hidrólise de fosfolipídios fluorescentes (Fig. 11A) verificou-se que o substrato NBD-PC foi o mais favorável para ação catalítica das enzimas, quando comparado com os demais fosfolipídios (NBD-PE, NBD-PA e NBD-PG).

Ambas as enzimas, nativa e recombinante, apresentaram atividade inibitória sobre a agregação plaquetária de maneira dose-dependente, utilizando como indutor de agregação o ADP (Fig. 11B) e atividade hipotensora *in vivo* (Fig. 11C).

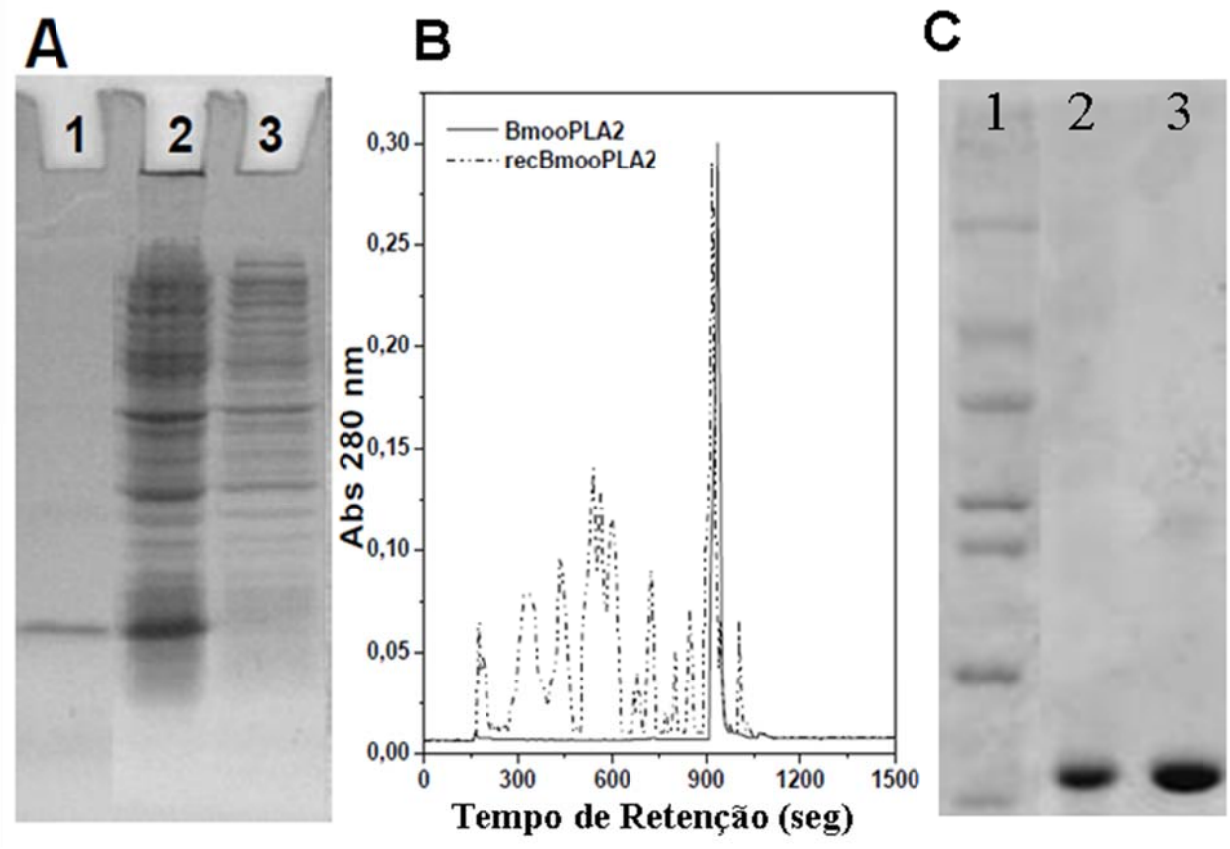


Figura 10. (A) Análise eletroforética em SDS-PAGE da proteína do corpo de inclusão (pETP-21) induzida por IPTG 1,0 mM. 1- $BmooPLA_2$ ácida nativa (10 µg); 2- Extrato de células transformadas e induzidas com IPTG; 3- não induzidas. **(B)** Purificação da proteína recombinante através de RP-HPLC. Estão ilustradas as curvas de amostras das proteínas nativa e recombinante de $BmooPLA_2$ submetidas a gradiente crescente de acetonitrila. **(C)** SDS-PAGE das proteínas purificadas. 1. Padrão de massa molar 14, 21, 24, 29, 34, 45 e 66 kDa; 2- $BmooPLA_2$ recombinante (10 µg); 3- $BmooPLA_2$ nativa (20 µg).

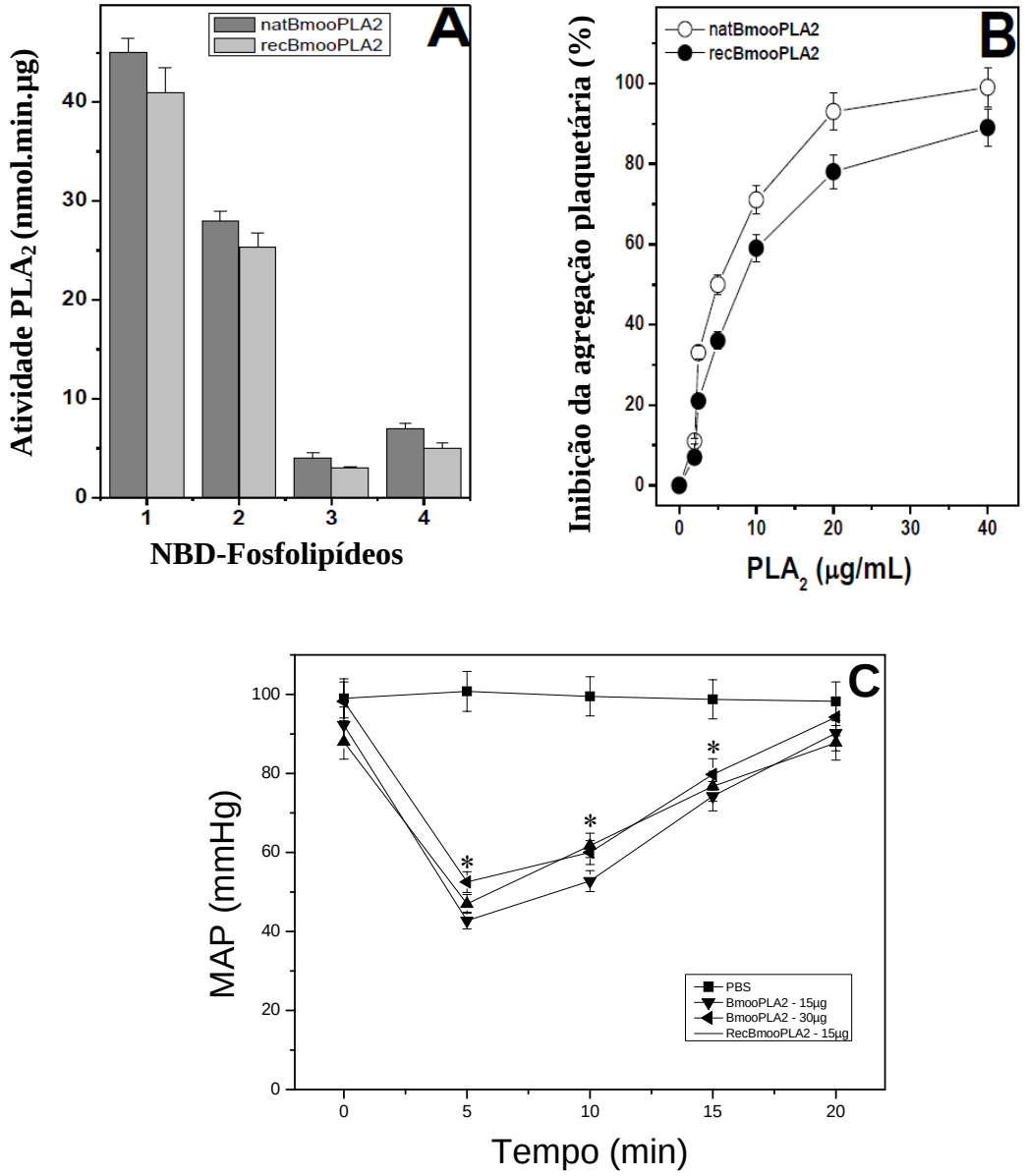


Figura 11. Efeito da BmooPLA$_2$ nativa e recombinante sobre (A) hidrólise de substratos fluorescentes (NBD-fosfolipídeos), (B) agregação plaquetária induzida por ADP (10mM) e (C) efeito hipotensor. **(A)** A hidrólise de NBD-fosfolipídeos pela BmooPLA$_2$ nativa ou recombinante (15 µg/mL). Barras 1 (NBD-PC), Barras 2 (NBD-PG), Barras 3 (NBD-PA) e Barras 4 (NBD-PE), depois de 4 min. de reação a temperatura ambiente. **(B)** BmooPLA$_2$ nativa ou recombinante (0-40 µg/mL) foi pré incubada a 37°C, sob agitação por 2 minutos, em seguida a agregação foi induzida por 10 mM/mL de ADP. A agregação máxima foi atingida em 6 minutos após a adição de colágeno e comparados com os valores obtidos na presença das PLA$_2$. Os resultados foram apresentados pela média ± SD (n = 4) de dois experimentos individuais. **(C)** A pressão arterial média de ratos foi registrada antes (0 min) e depois (5, 10, 15 e 20 min), da injeção (i.v.) das enzimas (15 e 30 µg) ou PBS, em condições idênticas. Resultados expressos pela média ± SD (n=5).* P < 0,05 em relação ao controle.

4.3. Mecanismo de inflamação induzida pela BmooPLA$_2$

A concentração de PGE2, TXB2 e LTB4 na cavidade peritoneal dos camundongos, foi avaliada no sobrenadante do lavado peritoneal coletado, após 6 e 24 horas da incubação da toxina ou salina apirogênica (Controle) com as células (Figs. 12A, 12B e 12C). A escolha da dose da toxina (12,6 mg/kg) foi baseada em dados da literatura (ZAMUNÉR et al., 2001).

A concentração das PLA$_2$s empregada foi previamente testada quanto à citotoxicidade, pela análise da atividade de lactato desidrogenase (LDH). Em períodos de até 24 h, esta concentração não alterou de modo significativo ($p > 0,05$) a viabilidade celular (> 90% células viáveis) (Figs. 13A e B).

A Figura 11A mostra que a injeção i.p. de BmooPLA$_2$ causou aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração da PGD2 no período de 6 horas, com aumento percentual médio de 378%, para a proteína nativa e 531% para a proteína recombinante, em comparação aos controles. No tempo de 24 horas, a liberação induzida pela proteína nativa teve um decréscimo de 145%, enquanto que a proteína recombinante aumentou ainda mais a quantidade de PGE$_2$, chegando a 619%, em relação ao controle ($p > 0,05$).

Para a TXB$_2$ (Fig 12B) observou-se um aumento de 25% com a proteína nativa e 48% com a recombinante, no tempo de 6 horas, e 5% (nativa) e 48% (recombinante) em 24 horas, todos em relação aos controles. Quanto à liberação de LTB$_4$ (Fig. 12C), para o tempo de 6h, a proteína nativa não induziu liberação, já a proteína recombinante provocou um aumento de 118%. No tempo de 24 horas não houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

A expressão da COX-2 foi analisada em macrófagos peritoneais residentes, isolados e incubados em suspensão, com as proteínas, nativa e recombinante, ou apenas em meio de cultura (RPMI) (Controle), por 1, 3, e 24 horas. As figuras 14A, 14B e 14C demonstram as bandas imunoreativas para COX-2, obtidas em células controles ou incubadas com as proteínas, nativa ou recombinante. Como mostra a Figura 14B, para a proteína nativa não houve aumento significativo das intensidades das bandas de COX-2 em nenhum dos períodos, em relação aos controles ($p < 0,05$). Já para a proteína recombinante, observou-se um aumento significativo tanto para 3 quanto para para 24 horas ($p < 0,05$).

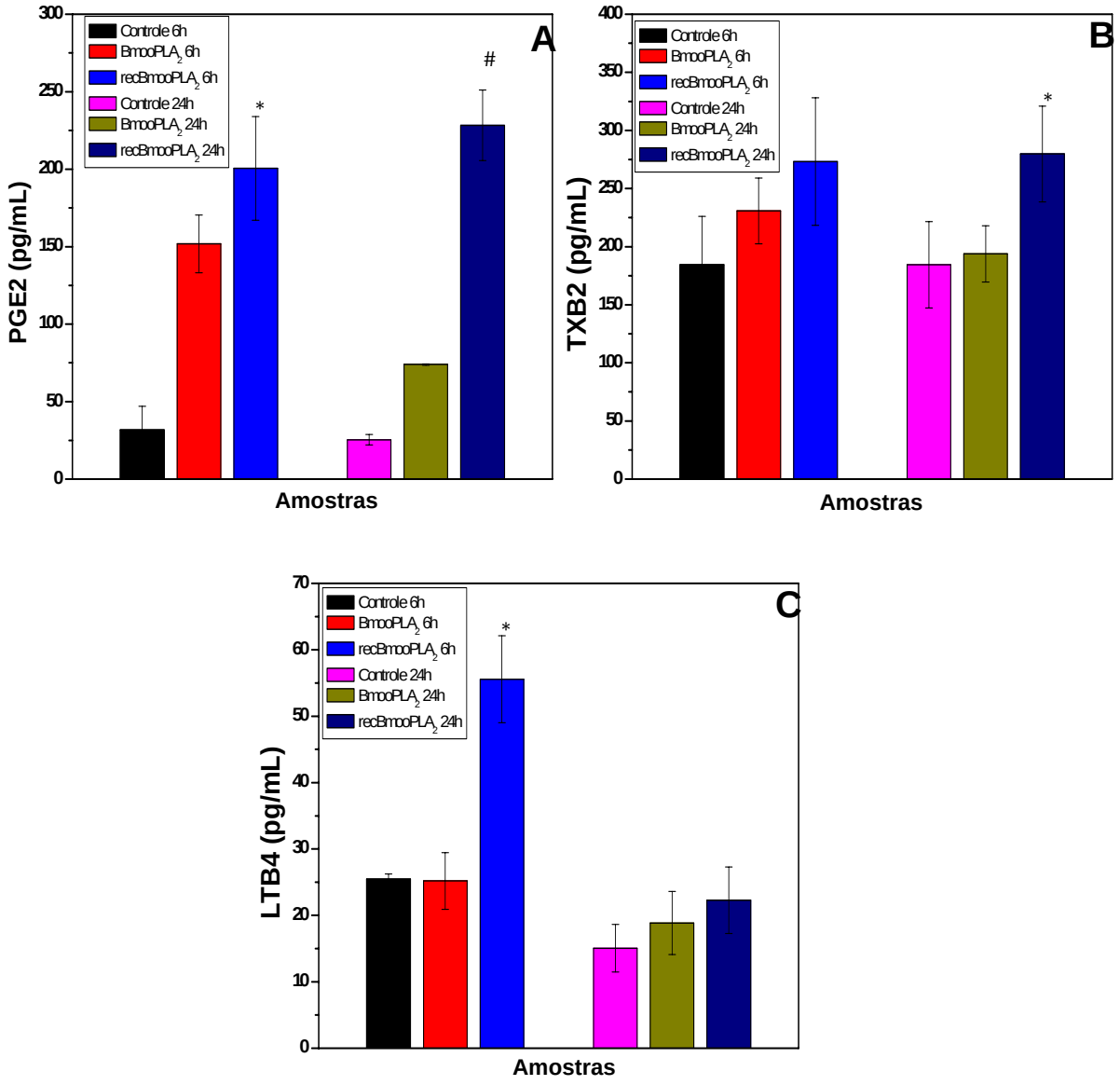


Figura 12. (A) Efeito da BmooPLA$_2$ nativa e recombinante na expressão de PGE$_2$, (B) TXB$_2$ e LTB$_4$. Os animais receberam injeção i.p. das proteínas nativa ou recombinante (12,6 mg/kg) ou salina apirogênica (0,9%) (Controle). As concentrações de PGE$_2$ **(A),** TXB$_2$ **(B)** e LTB$_4$ **(C)** foram avaliadas por EIA em lavados peritoneais coletados 6 e 24 horas após as injeções. Os dados representam a média ± E.P.M. de 4-5 animais. * $p < 0,05$, em relação aos controles. # $p < 0,05$ em relação à proteína nativa.

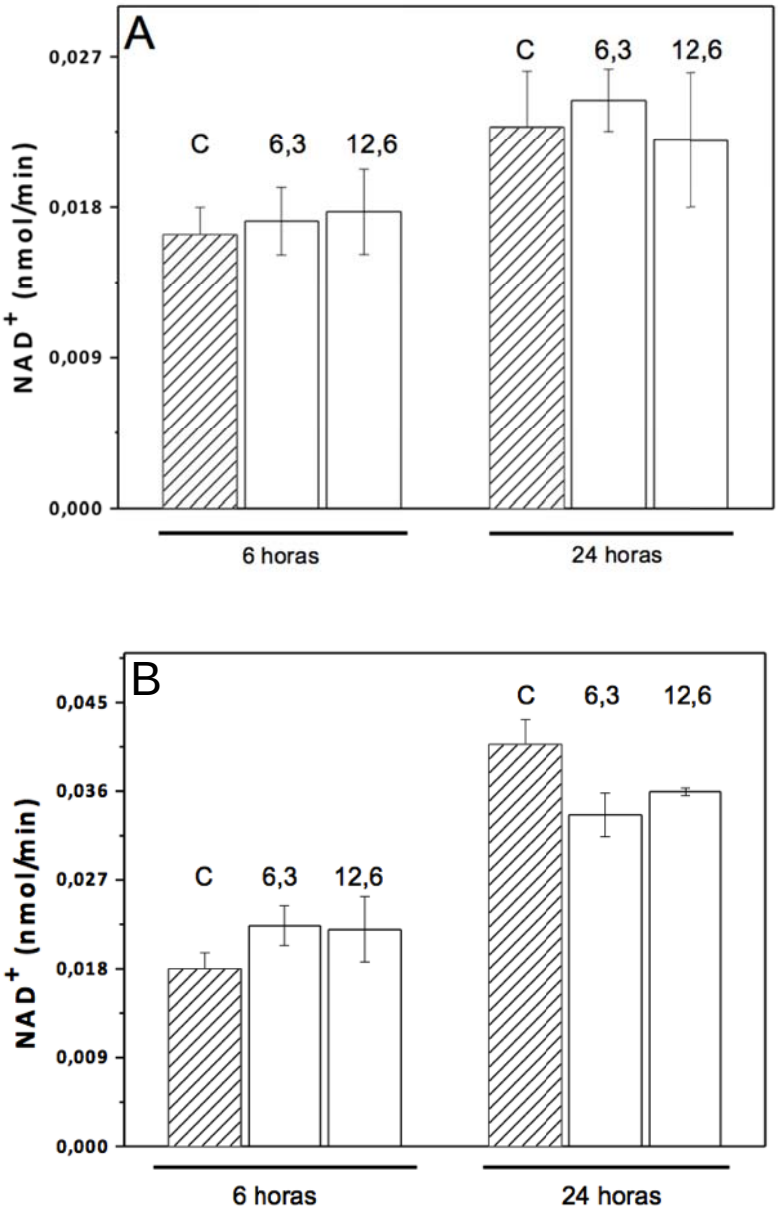


Figura 13. Efeito das toxinas nativa (A) e recombinante (B) na viabilidade de células em cultura. $2x10^5$ células/poço foram aderidas em micro placas de 96 poços e incubadas com as PLA_2s, nas concentrações de 6,3 e 12,6 mg/mL ou TRITON X-100 0,1% por 6 e 24 horas, a 37 °C e 5% de CO_2. A viabilidade celular dos macrófagos foi avaliada pelo ensaio da atividade da LDH, não havendo diferença significativa entre as amostras e o controle ($p > 0,05$). Cada dado representa a média ± E.P.M. de 3-5 experimentos independentes, realizados em triplicata.

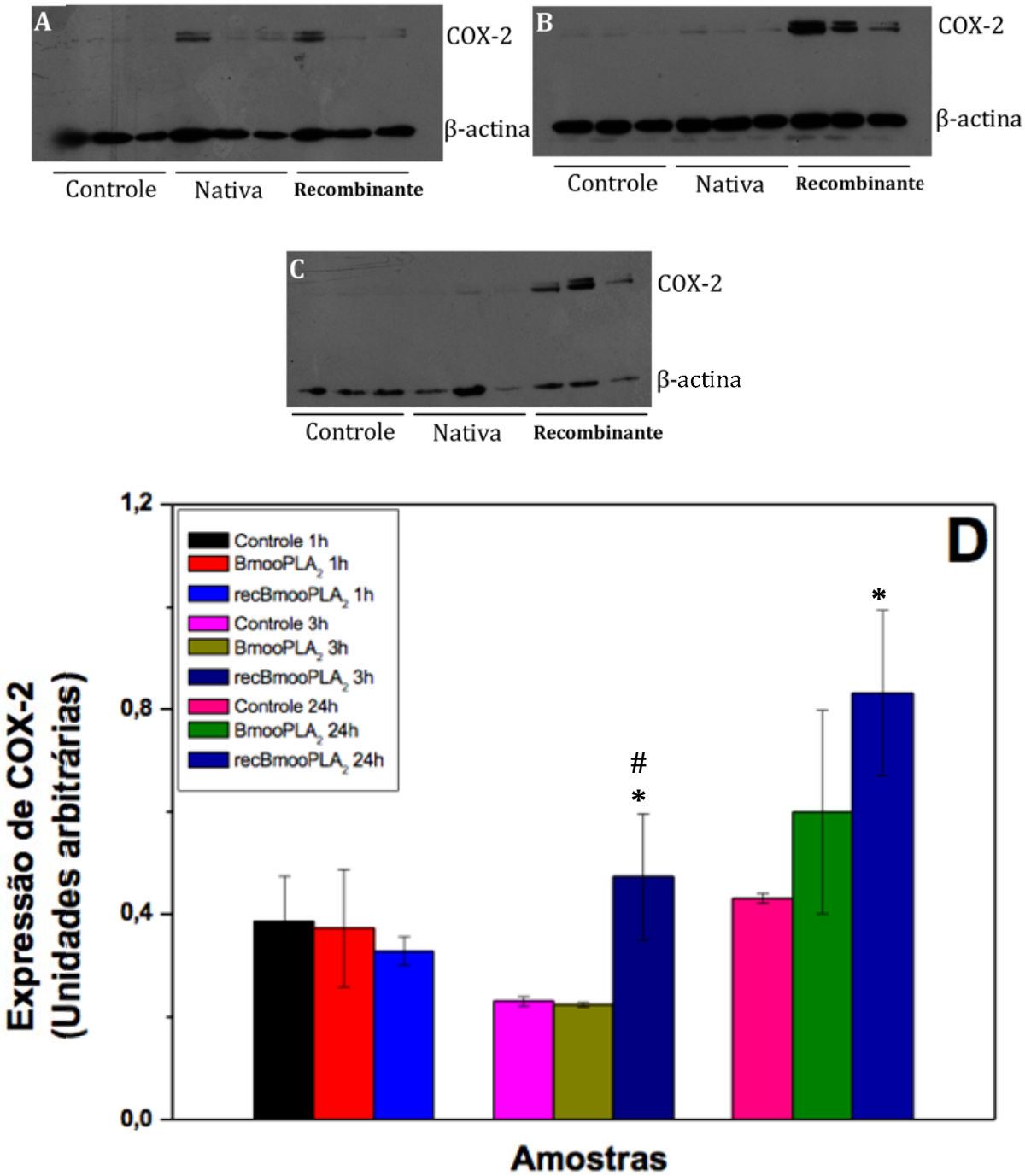


Figura 14. Efeito da BmooPLA$_2$ nativa e recombinante na expressão de COX-2 por macrófagos peritoneais. Macrófagos peritoneais foram coletados 1, 3, e 24 h após a injeção i.p. da toxina nativa ou recombinante (12,6 mg/kg) ou salina apirogênica (Controle). As células foram lisadas e submetidas ao *western blot*: Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-2, normalizadas a partir das bandas de β-actina nos tempos de **(A)** 1 hora, **(B)** 3 horas e **(C)** 24 horas. **(D)** *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-COX-2 (1:2500) e anticorpo monoclonal anti-β-actina (1:2000), representativo de amostras de homogenatos de macrófagos peritoneais de camundongo (n=3). * $p < 0,05$, em relação aos controles. # $p < 0,05$ em relação à BmooPLA$_2$ 3 h.

4.4. Caracterização estrutural

4.4.1 Alinhamento múltiplo

O múltiplo alinhamento entre a estrutura primária da BmooPLA$_2$, obtida por sequenciamento do seu cDNA, e estruturas de outras PLA$_2$ ácidas de *Bothrops*, depositadas no banco de dados estrutural (NCBI BLAST / FASTA: (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) foi gerado usando o programa *CLUSTAL W 1.8*. A análise do alinhamento múltiplo demonstra uma elevada similaridade estrutural entre as PLA$_2$s ácidas botrópicas. Todas estas proteínas apresentam regiões conservadas características das PLA$_2$s, incluindo os resíduos do sítio catalítico, em vermelho (His48, Asp49, Tyr52 e Asp99), a região N-terminal (12 resíduos iniciais) e o sítio ligante de cálcio, em azul (Tyr28, Gly30 e Gly32), além dos 14 resíduos de cisteína (em laranja), responsáveis pela formação das 7 pontes de dissulfeto (Fig. 15). O sistema de numeração dos resíduos supracitados foi proposto por Renetseder *et al*. (1985).

```
                                    20                  40                  60
BmooPLA2        NLWQFEMLIMKIAK-TSGFLFYSSYGCYCGWGGHGRPQDATDRCCFVHDCCYGKVT--G-
BmooTX-I        NLWQFEMLIMKIAK-TSGFMFYSSYGCYCGWGGHGRPQDATDRCCFVHDCCYGKVT--G-
BE-I-PLA2       SLVQFETLIMKIAG-RSGVWYYGSYGCYCGSGGQGRPQDASDRCCFVHDCCYGKVT--D-
BpirPLA2-I      NLWQFGKLIMKIAG-ESGVFKYLSYGCYCGLGGQGQPTDATDRCCFVHDCCYGKVT--G-
BaspPLA2-II     NLWQFGQMMSDVMR-KNVVFKYLSYGCYCGWGGIGQPKDATDRCCFVHDCCYGKVT--G-
BthA-I-PLA2     SLWQFGKMINYVMG-ESGVLQYLSYGCYCGLGGQGQPTDATDRCCFVHDCCYGKVT--G-
BinTX-I         NLWQFGKMMNYVMG-QSVVYKYFYYGCYCGWGGIGQPRDATDRCCFVHDCCYGKVT--G-
BJ-PLA2         DLWQFGQMMNDVMR-EYVVFNYLYYGCYCGWGGIGKPRDATDRCCFVHDCCYGKVT--G-
Bp-PLA2         NLVQFETLIMKIAG-RSGVWYYGSYGCYCGSGGQGRPQDASDRCCFVHDCCYGKVT--D-
BinTX-II        NLWQFGRENQEVMG-QHLPFHYLSYGCYCGWGGIEP------KCCYVHDCCYGKLD----
                .* **      :          *  ****** **         :**:********:

                          80                  100                 120
BmooPLA2        C-----NPKTDS--YTYSEENGDVV-CGGDDPCKKQICECDRVAATCFRDNKDTYDNKYW
BmooTX-I        C-----DPKTDL--YTYSKENGDLV-CGGDDPCKKQICECDRVAALCFRDNKDTYDQKYW
BE-I-PLA2       C-----DPKADV--YTYSEENGVVV-CGGDDPCKKQICECDRVAATCFRDNKDTYDNKYW
BpirPLA2-I      C-----DPKIDS--YTYSKENGDVV-CGGDDPCKKQICECDRVAATCFRDNKDTYDIKYW
BaspPLA2-II     C-----DPKMDIYTYTYSKENGDVV-CGGDDPCKKQICECDRVAAICFRDNKDTYDSKYW
BthA-I-PLA2     C-----DPKIDS--YTYSKKNGDVV-CGGDDPCKKQICECDRVATTCFRDNKDTYDIKYW
BinTX-I         C-----DPKTDS--YTYSKENGDVV-CGGDDPCKKQICECDRVAATCFRDNKDTYDMKYW
BJ-PLA2         C-----NPKTDSYTYTYSEENGDVV-CGGDDLCKKQICECDRVAATCFRDNKDTYDTKYW
Bp-PLA2         C-----DPKADV--YTYSEENGVVV-CGGDDPCKKQICEVRQGCGNLLPRHKDTYEHNIL
BinTX-II        --------K----LYTYSKETGDLV-CGGDDPCQKQLCECDRVAALCFQDNKDTYDQK--
                             ****::.* :* ***** *:**:**  : .   :  :****: :

                             136   Similaridade (%)
BmooPLA2        FY-PAKN-CQEESEPC
BmooTX-I        LY-NAKN-CQEESEPC        95,9
BE-I-PLA2       FF-PAKN-CQEESEPC        89,3
BpirPLA2-I      FY-GAKN-CQEESEPC        88,5
BaspPLA2-II     FY-GAKN-CQEDSEPC        86,3
BthA-I-PLA2     FY-GAKN-CQEKSEPC        86,1
BinTX-I         LY-GAKN-CQEESEPC        86,1
BJ-PLA2         LY-GAKN-CQEESEPC        83,9
Bp-PLA2         VF-PAKTFAKKESEPC        75,6
BinTX-II        PY-NAEN-CQEASEAC        67,2
                 :  *:. .:  **.*
```

Figura 15. Múltiplo alinhamento de sequências de BmooPLA$_2$ e outras PLA$_2$s de peçonhas de serpentes. BinTX-I (*Bothrops insularis*, gi 26006832), BJ-PLA$_2$ (*B. jararaca*, gi 3914258), BaspPLA$_2$-II (*B. asper*, gi 292630844), BinTX-II (*B. insularis*, gi 158518414), BpirPLA$_2$-I (*B. pirajai*, gi 258676481), BthA-I-PLA$_2$ (*B. jararacussu*, gi 25140377), Bp-PLA$_2$ (*B. neuwiedi pauloensis*, gi 261362120), BE-I-PLA$_2$ (*B. erythromelas*, gi 86450426) e BmooTX-I (*B. moojeni*, SANTOS-FILHO, comunicação pessoal, 2011).

4.4.2. Modelagem teórica por homologia

A proteína $BmooPLA_2$ por ter sua estrutura primária determinada nos possibilitou predizer um modelo tridimensional por modelagem teórica, por homologia. O modelo teórico desta PLA_2 ácida foi gerado pelo método de satisfação de restrições espaciais utilizando o programa *Modeller 9v7* (SALI; BLUNDELL, 1993). Os modelos foram preditos na ausência do íon Ca^{2+} (forma apo das enzimas).

Cinco modelos teóricos foram gerados. O programa *Modeller 9v7* não aplica somente restrições espaciais baseadas em homologia ao modelo. Um campo de força para controlar a estereoquímica apropriada também foi aplicado para que a estrutura do modelo teórico não violasse as regras que satisfazem as restrições espaciais derivadas das estruturas-molde. Todas as restrições químicas e espaciais aplicadas ao modelo foram combinadas em uma função (função objetiva) minimizada no curso do processo de construção dos modelos. A presença de todas as regiões energeticamente desfavoráveis entre os modelos gerados e seus respectivos modelos-molde foi avaliada pela função "DOPE - Discrete Optimized Protein Energy" (SHEN; SALI, 2006). A qualidade estereoquímica e confiabilidade estrutural dos modelos estruturais teóricos da $BmooPLA_2$ foram avaliadas no servidor SAVES ("Structural Analysis and Verification Server"), disponível no endereço eletrônico http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/.

Os modelos teóricos gerados apresentaram enovelamento estrutural compatível com as demais PLA_2s isoladas de peçonhas de serpentes das subfamílias Crotalinae e Viperinae previamente determinadas por cristalografia de raios X. Os modelos tridimensionais teóricos são compostos por uma região N-terminal (resíduos 1-12), representada pela α-hélice I ("h1") – região envolvida na ligação e orientação de substratos à proteína (canal hidrofóbico das PLA_2s); em seguida tem-se a hélice curta (*short helix*) formada pelos resíduos 18-23. Entre os resíduos 25-34 está localizado o *loop* de ligação do íon Ca^{+2}, seguido pela α-hélice II ("h2") (resíduos 40-55), a qual se liga a uma curta folha β antiparalela (*β-wing*) (resíduos 75 a 77 e 82 a 84). Após a região de *β-wing*, os resíduos 90-107 formam a α-hélice III ("h3"), que se liga a uma região bastante flexível, denominada *loop* do C-terminal (resíduos 108-133). Estes três últimos segmentos, "h2", *β-wing* e "h3" alocam resíduos que constituem o sítio catalítico (His48, Asp49, Tyr52 e Asp99) das PLA_2s (ARNI; WARD, 1996; WARD et al., 1998). O sistema de numeração dos resíduos supracitados foi proposto por Renetseder *et al*. (1985).

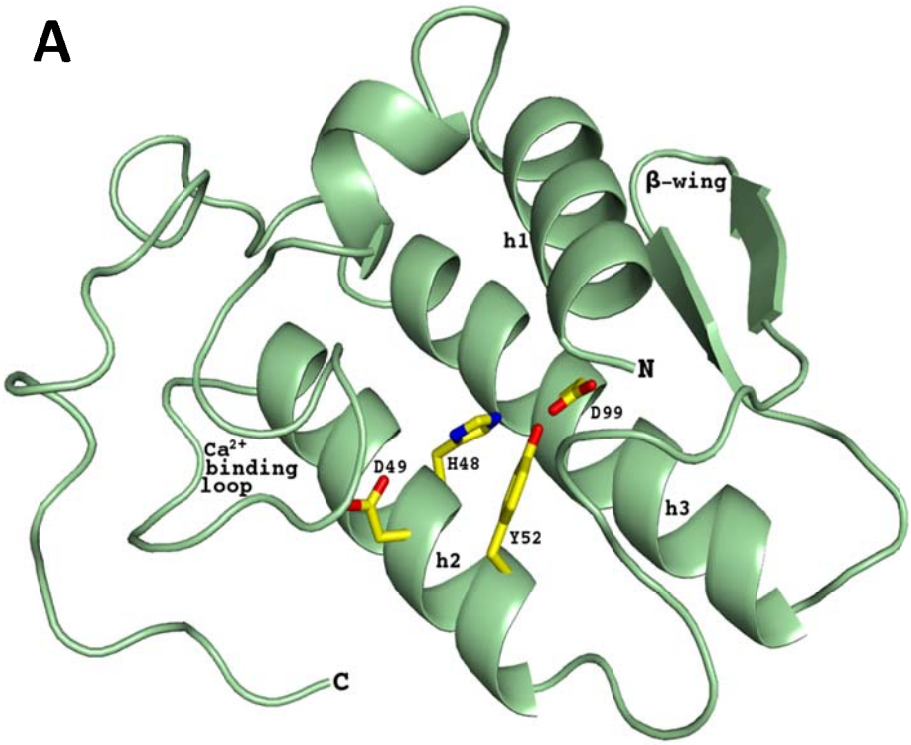
4.4.2.1. $BmooPLA_2$

O modelo teórico da $BmooPLA_2$ foi gerado a partir do modelo experimental de três estruturas cristalográficas da $BthA\text{-}I\text{-}PLA_2$ depositadas no PDB sob os códigos: 1IJL (cadeias

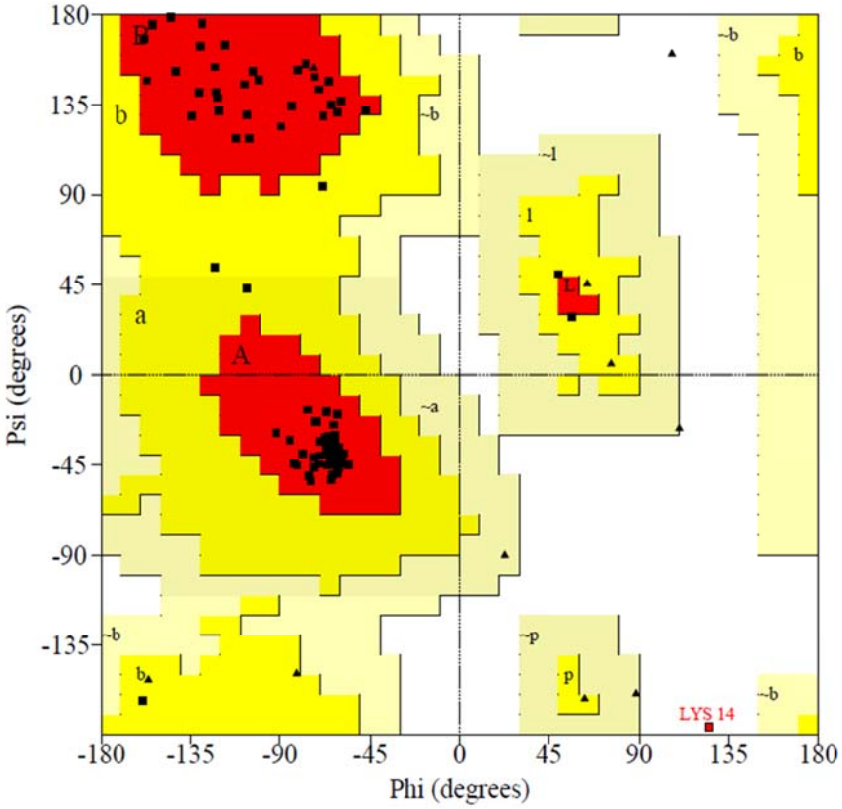
A e B), 1U73 (cadeias A e B) e 1UMV) com 79% de identidade sequencial entre as sequências de aminoácidos dos modelos e a sequência da $BmooPLA_2$.

O modelo teórico final da $BmooPLA_2$ (Figura 16A) apresentou aceitável estereoquímica com 93,3% dos resíduos de aminoácidos dispostos nas regiões mais favoráveis, 5,8% nas regiões adicionalmente permitidas e apenas1,0% nas regiões não permitidas do gráfico de Ramachandran (LASKOWSKI, 1993) (Figura 16B). Na figura 16C observa-se uma comparação esntre as estruturas tridimensionais da $BmooPLA_2$ com outras duas PLA_2 de peçonhas botrópicas, BthA-I, uma PLA_2 Asp49 ácida da peçonha de *B. jararacuçu*, e PrTX-I, uma Lys49 básica de *B. pirajai*. Podemos observar que a estrutura predita da $BmooPLA_2$ está condizente com estrutura de outras PLA_2 já descritas e obtidas experimentalmente.

A


β-wing
h1
N
D99
Ca2+
binding
loop
D49
H48
h3
Y52
h2
C

B


Psi (degrees)
Phi (degrees)
180
135
90
45
0
-45
-90
-135
-180
LYS 14

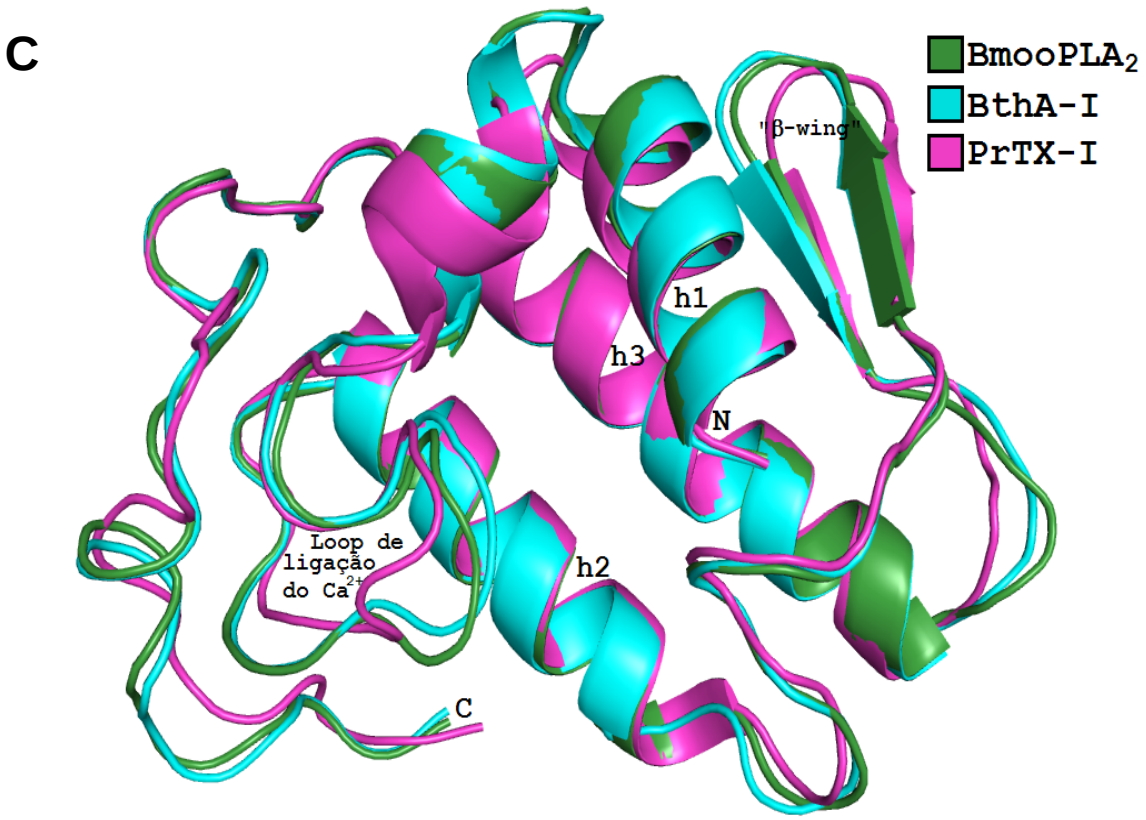


Figura 16. (A) Modelo tridimensional da $BmooPLA_2$ gerado por modelagem teórica por homologia – programa "PyMol" (DeLANO, 2002). **(B)** Diagrama de Ramachandran: 93,3% dos resíduos encontrados nas regiões mais favoráveis (vermelho), 5,8% nas regiões adicionalmente permitidas (amarelo escuro) e 1,0% nas regiões não permitidas (branco) – programa PROCHECK (LASKOWSKI, 1993). **(C)** Comparação entre as estruturas tridimensionais da $BmooPLA_2$ e outras duas PLA_2 de peçonhas de serpentes da família Viperidae.

4.4.3. Cristalização da BmooPLA$_2$

Da busca inicial realizada utilizando-se kits comercializados pela Hampton Research® (Califórnia, EUA), várias condições destacaram-se e tiveram algum parâmetro alterado na tentativa de obter monocristais que pudessem ser submetidos à difração de raios X. A solução contendo 30% (p/v) Polietilenoglicol (PEG) 1500, apresentou vários policristais sem forma definida (Figura 17A), os quais não possibilitaram coleta de dados. Variações na concentração do PEG [28% (Figura 17B) e 32% (Figura 17C)] foram empregadas na tentativa de obter monocristais com arestas definidas.

Prosseguindo na busca de condições favoráveis à formação de cristais, outra solução de precipitação se destacou: 20% (p/v) PEG 8000 / 0,05 M Fosfato de Potássio (Figura 18). Buscando-se obter monocristais foram realizadas diversas variações de pH, de concentração salina e do PEG, bem como do tipo de PEG, porém, até o presente não houve formação de monocristal com volume e forma que possibilitasse a coleta dos dados de difração de raios X, para que a estrutura tridimensional pudesse ser elucidada.

Após várias retomadas e tentativas, observou-se que em uma terceira solução de cristalização (30% (p/v) PEG 4000 / 0,2 M Acetato de Amônio / 0,1 M Acetato de Sódio pH 4,6) houve a formação de microcristais regulares (Figura 18A). Na tentativa de se obter monocristais regulares, a concentração do PEG 4000 foi alterada para 28% (p/v) (Figura 19B)

Na tentativa de aumentar o volume cristalino, os microcritais foram submetidos à técnica de *seeding* (*macroseeding / streakseeding*) (BERGFORS, 1999). Para a realização da referida técnica os microcristais, com auxílio de um aparato contendo um fio de cabelo sem tintura, foram transferidos da gota inicial para novas gotas contendo mais amostra protéica a fim de continuar seu crescimento por união de mais moléculas protéicas e consequente aumento do volume cristalino.

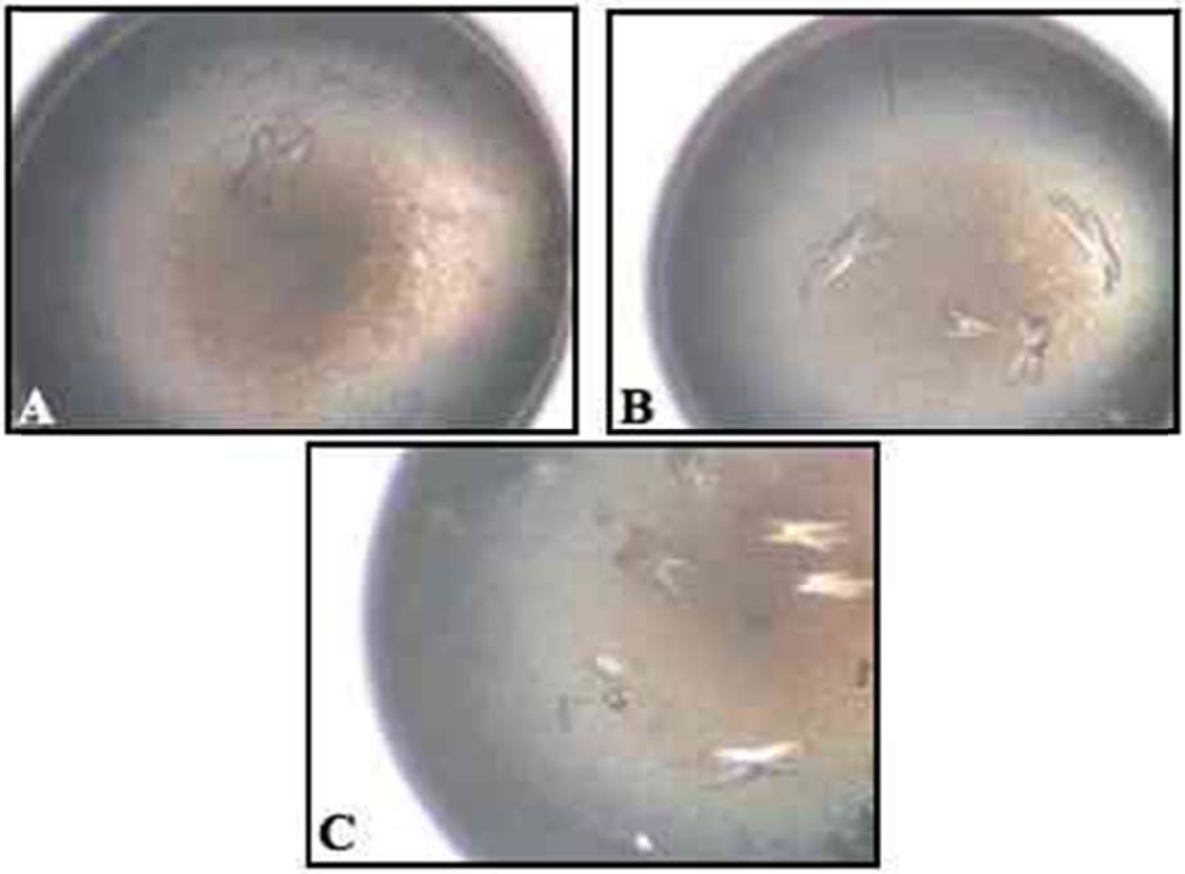


Figura 17. Cristais da BmooPLA$_2$ formados após 15 dias. (**A**) Policristais irregulares (30% (p/v) PEG 1500); (**B**) Policristais irregulares (28% (p/v) Polietilenoglicol (PEG) 1500); (**C**) Monocristais regulares (32% (p/v) Polietilenoglicol (PEG) 1500).

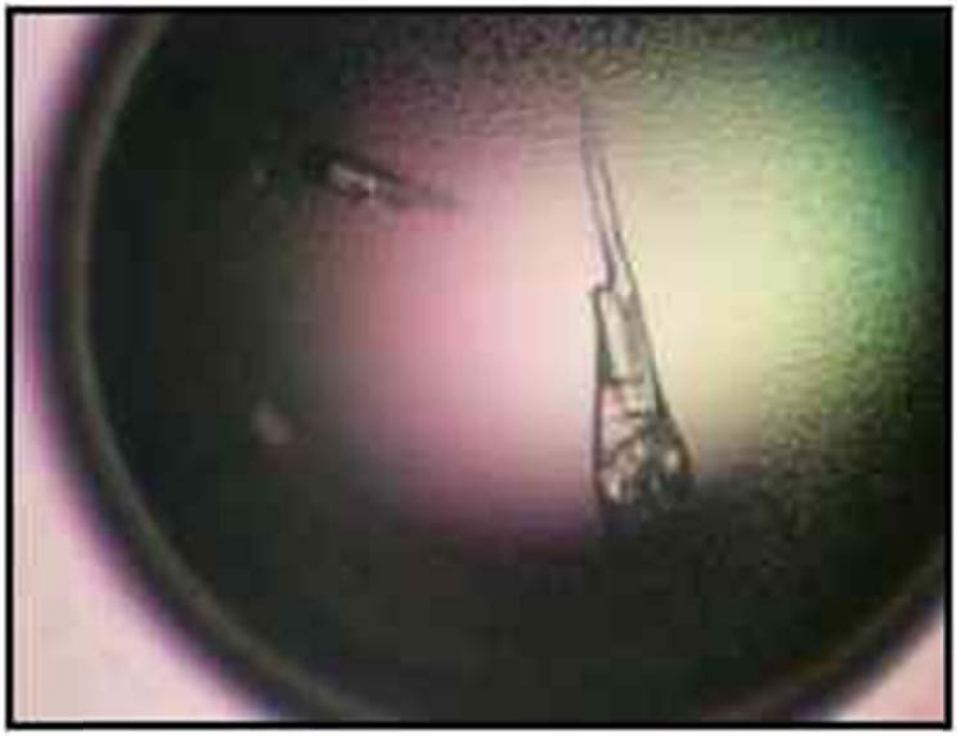


Figura 18. Policristais regulares da $BmooPLA_2$ formados após 12 dias.

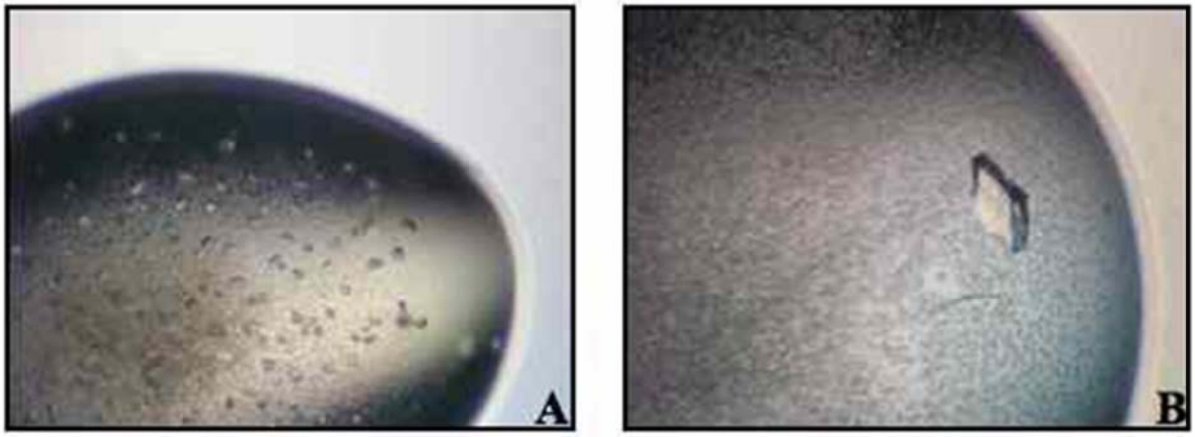


Figura 19 A e B. Microcristais regulares da $BmooPLA_2$ formados após 18 dias.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e caracterização bioquímica da PLA_2 ácida isolada da peçonha de *B. moojeni*

As PLA_2s de peçonhas de serpentes têm sido extensivamente estudadas por serem relativamente abundantes em algumas espécies e, em adição à sua atividade enzimática, apresentam ampla variedade de efeitos farmacológicos (SOARES et al., 2004a; TEIXEIRA et al., 2009; GALLACCI e CAVALCANTE, 2010).

A combinação das cromatografias de troca iônica (CM-Sepharose- Fig. 3A) e hidrofóbica (Phenyl-Sepharose- Fig. 3C) mostraram-se eficientes no isolamento e purificação de uma isoforma de fosfolipase A_2 ácida, denominada de $BmooPLA_2$, presente na peçonha de *Bothrops moojeni*. A cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de fase reversa resultou na obtenção de material altamente puro (Fig. 10), porém em pequena quantidade, confirmando o grau de pureza desta enzima. Enquanto que, no passo de cromatografia em Phenyl-Sepharose utilizada neste trabalho, foi obtida uma maior quantidade de material também em elevado grau de pureza, como pode ser demonstrado pela SDS-PAGE (Fig. 4A). Diversas peçonhas de serpentes já foram fracionadas utilizando procedimentos simplificados baseados em CM-Sepharose e/ou RP-HPLC, como por exemplo as peçonhas de *Bothrops moojeni* (SOARES et al., 2000a; STABÉLI et al., 2006; SANTOS-FILHO et al., 2008), *B. pirajai* (SOARES et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2011), *B. jararacussu* (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; 2002), *B. (n.) pauloensis* (RODRIGUES et al., 2007), *Bothrops alternatus* (GARCIA-DENEGRI et al., 2010) *Cerastes cerastes* (ZOUARI-KESSENTINI et al., 2009) e *Elaphe climacophora* (SHIRAI et al., 2009).

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) demonstrou o alto grau de pureza da proteína isolada e a análise por espectrometria de massa revelou uma massa molar de 13.601 Da (Fig. 4B). Esta massa molar está condizente com a maioria das PLA_2s isoladas de peçonhas de serpentes, que gira em torno de 13.000 a 16.000 Da (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; OWNBY et al., 1999; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; BAZAA et al., 2009; SUN et al., 2009). Observou-se também, que a $BmooPLA_2$ apresenta ponto isoelétrico igual a 5,2 (Fig. 4C) e forma monomérica na presença ou ausência de agentes redutores (Fig. 4A), semelhantemente à BthA-I-PLA_2 isolada de *B. jararacussu* (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002).

A BmooPLA$_2$ demonstrou uma alta atividade catalítica (Fig. 5A) quando comparada com PLA$_2$ básica de *B. jararacussu* (BthTX-II) (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000) e muito semelhante à BthA-I-PLA$_2$, também de *B. jararacussu (*ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002*)*. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com estudos anteriores envolvendo PLA$_2$s de peçonhas de serpentes, nos quais as PLA$_2$s Asp49 ácidas são cataliticamente mais ativas do que suas isoformas básicas (ROSENBERG et al., 1983; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002). A atividade fosfolipásica da BmooPLA$_2$ avaliada em soluções de pH variando de 2 a 10, demonstrou uma alta estabilidade da enzima em todos os valores testados (Fig. 5B). Na faixa de pH próxima ao pI da BmooPLA$_2$ podemos observar um decréscimo na atividade da enzima. Uma vez que estes valores são próximos, a proteína perde sua carga levando a uma diminuição de sua atividade..

Em relação à atividade enzimática da BmooPLA$_2$ em iferentes temperaturas, apenas uma pequena variação após a incubação em todas as temperaturas testadas foi observada, mantendo ainda uma alta atividade, mesmo após a incubação em temperaturas superiores a 80ºC (Fig. 5C). Esta estabilidade se dá principalmente devido a presença de 7 pontes de dissulfeto, estando de acordo com a literatura, que mostra que as PLA$_2$s são enzimas termoestáveis (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997; PONCE-SOTO et al., 2002; SANTOS-FILHO et al., 2008). Porém, nem todas as PLA$_2$s de peçonhas de serpentes são estáveis em altas temperaturas. Diz Filho e colaboradores (2009) relataram o isolamento de duas PLA$_2$s da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*, das quais uma delas perde sua atividade em temperaturas superiores a 60ºC.

A BmooPLA$_2$ demonstrou um efeito inibitório sobre a agregação plaquetária induzida pelo ADP e colágeno, em plasma rico em plaquetas de maneira dose-dependente, sendo maior sobre o ADP (Fig. 7A). A agregação plaquetária desempenha um papel importante na coagulação do sangue. Esta enzima purificada tem efeito antiagregante, além de uma elevada atividade enzimática.

As funções plaquetárias podem ser afetadas por diversas toxinas de peçonhas de serpentes, onde as principais delas podem ser agrupadas em cinco grandes famílias: enzimas tipo serinoproteases, metaloproteases zinco dependentes das classes PI a PIV da família das reprolisinas e as isoenzimas PLA$_2$s do grupo II, além das proteínas sem atividade enzimática, como, Lectinas do tipo-C, CRISP e desintegrinas (ANDREWS; BERNDT, 2000; WISNER et al., 2002; JUÁREZ et al., 2004).

De acordo com seu efeito sobre plaquetas, as PLA$_2$s de peçonhas de serpentes podem ser divididas em três grupos: classe A, a qual inclui as fosfolipases capazes de induzir a

agregação plaquetária; classe B: PLA_2s que inibem a agregação plaquetária, induzida por vários agonistas fisiológicos; classe C: PLA_2s que apresentam resposta bifásica sobre plaquetas (possuem propriedades pró e anti-agregante) (KINI; EVANS, 1997). De acordo com essa classificação, a $BmooPLA_2$ pode ser agrupada na classe das PLA_2s que possuem atividade anticoagulante.

No caso das PLA_2s enzimaticamente ativas, a atividade dessas proteínas sobre a agregação plaquetária pode estar relacionada ao fato de clivarem fosfolipídeos presentes na membrana de plaquetas liberando ácido araquidônico e formando seus metabólitos, como a prostaciclina (prostaglandina I2), substância que atua na inibição da agregação plaquetária, e o tromboxano, composto que atua na ativação da agregação plaquetária (FULY et al., 2003; 2004). Como a $BmooPLA_2$ possui uma alta atividade catalíca, sua atividade sobre plaquetas provavelmente está relacionada com sua atividade enzimática.

Diversas PLA_2s ácidas de peçonhas de serpentes já foram estudadas quanto a sua atividade sobre plaquetas, como BthA-I-PLA_2 de *B. jararacussu* (ANDRIÃO-ESCARSO et al. 2002; ROBERTO et al. 2004), BE-I-PLA_2 de *B. erythromelas* (DE ALBUQUERQUE MODESTO et al. 2006), LM-PLA_2-II de *Lachesis muta* (FULY et al. 2002), TJ-PLA_2 de *Trimeresurus jerdonii* (LU et al. 2002), BmooTX-I de *B. moojeni* (SANTOS-FILHO et al., 2008) e $BpirPLA_2$-I de *B. pirajai* (TEIXEIRA et al., 2011). Teixeira e colaboradores (2011) relataram que um peptídeo sintetizado a partir da região C-terminal da $BpirPLA_2$-I foi capaz de reproduzir a atividade inibidora de agregação plaquetária induzida por aquela enzima. Essa informação sugere que outras regiões da proteína, além do sitío catalítico, podem estar envolvidas nas atividades farmacológicas dessa classe de proteínas.

Com relação ao efeito hipotensor observado pela $BmooPLA_2$ (Fig. 7B), até o presente momento não existem informações estruturais que indiquem a presença de um sítio farmacológico nas PLA_2s, relacionado com a atividade hipotensora. De acordo com Huang and Lee (1984), tal atividade deve estar relacionada com a liberação de mediadores inflamatórios, a partir do ácido araquidônico (AA) liberado por estas enzimas, uma vez que o efeito hipotensor foi totalmente abolido após incubação da toxina com BPB (Fig. 7B). As prostaglandinas atuam no sistema renina angiotensina provocando alterações na pressão sanguínea (TEIXEIRA et al., 2011).

Estudos de modificação química de PLA_2s cataliticamente ativas utilizando BPB ajudam a confirmar esta hipótese, uma vez que toxinas modificadas com esse composto, perderam completamente sua atividade hipotensora, além de sofrerem uma redução total ou parcial de atividades como indução de edema, miotoxicidade e atividade sobre plaquetas

(ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; SOARES E GIGLIO, 2003; MARCHI-SALVADOR et al., 2009).

Essa redução da atividade pode estar relacionada tanto com a ligação do BPB ao sítio catalítico da PLA_2s cataliticamente ativas, impedindo o acesso ao substrato, ou por mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, uma vez que o BPB também foi capaz de se ligar ao resíduo de His48 das isoformas Lys49, provocando uma redução em atividades como miotoxicidade e indução de edema (SOARES e GIGLIO, 2003; MARCHI-SALVADOR et al., 2009).

Dentre as fosfolipases A_2 isoladas das peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* (aproximadamente 55) descritas até o momento, 34 são proteínas básicas e 21 são ácidas. Dentre estas últimas, todas apresentam atividade catalítica (SELISTRE DE ARAÚJO et al., 1990; LOMONTE et al., 1990; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; MANCUSO et al., 1995; SANTOS-FILHO et al., 2008; FERNANDÉZ et al., 2010). Um grande número de PLA_2s básicas tem sido purificadas por métodos bioquímicos convencionais e caracterizadas estrutural e funcionalmente. No entanto, devido à baixa concentração nas peçonhas, pouco se conhece sobre o mecanismo de ação das PLA_2s ácidas em geral, altamente catalíticas e indutoras de relevantes efeitos farmacológicos. Estas proteínas se constituem em importantes modelos no estudo da relação estrutura-função entre fosfolipases A_2 tóxicas e não tóxicas das peçonhas de serpentes, podendo contribuir para a elucidação estrutural dos determinantes de toxicidade.

A hipótese atual do mecanismo da atividade fosfolipásica afirma que as PLA_2s se ligam a um alvo localizado fora da célula e pode, consequentemente, alterar a função celular por dois mecanismos: 1) A hidrólise dos fosfolipídeos da membrana externa, que liberam lipídios biologicamente ativos, através da cadeia do ácido araquidônico (tromboxanos, prostaglandinas, leucotrienos, lisofosfolipídeos); 2) A vinculação à bicamada lipídica sem hidrólise, onde esta ligação física pode alterar a função celular. Em ambos os eventos a existência de um sítio de ligação é necessária (DE PAULA et al., 2009).

A sequência da região N-terminal e a análise comparativa com outras PLA_2s de peçonhas de serpentes (Fig. 6) demonstraram a presença de resíduos altamente conservados constituintes da estrutura de α-hélice característica desta região. Resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes na porção N-terminal parecem providenciar o acesso do substrato ao sítio catalítico (ARNI e WARD, 1996). Além disso, tais resíduos poderiam ter uma grande importância estrutural se relacionando às diferentes atividades farmacológicas exercidas pelas PLA_2s (DE PAULA et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2009).

A BmooPLA$_2$ também foi capaz de induzir edema na pata de camundongos em baixas concentrações (Tabela 1). A atividade edematogênica desta enzima foi consideravelmente mais baixa em relação às isoformas básicas (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000). A inflamação local é uma característica do envenenamento por serpentes das subfamílias Viperidae e Crotalidae (DENNIS, 1994; MOREIRA et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009). O edema local induzido por peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* parece ser mediado por substâncias vasoativas, como histamina e serotonina, além de prostaglandinas e cininas (GUTIÉRREZ et al., 1986). A atividade edematogênica induzida pela peçonha de serpertes do gênero *Bothrops* parece estar também relacionada com as metaloproteases, uma vez que o tratamento da peçonha com 1,10-fenantrolina, um inibidor de metaloproteases, foi o único efetivo na inibição do edema induzido pela peçonha bruta de *B. jararaca* (ZYCHAR et al., 2010). A degranulação de mastócitos e consequente liberação de serotonina parecem ser os passos iniciais na formação de edema nas patas de camundongos injetados com peçonhas de serpentes. Além disso, substâncias lipídicas liberadas a partir da atividade catalítica de PLA$_2$s serviriam como precursores de mediadores pró inflamatórios envolvidos no processo edematogênico (TEIXEIRA et al., 2003; ZULIANI et al., 2005).

Diversos estudos acerca da participação das PLA$_2$s de peçonhas de serpentes nos processos inflamatórios tem sido realizados (RUCAVADO et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2003b, 2009; ZULIANI et al., 2005). Contudo, nenhum estudo abordou ainda as PLA$_2$s ácidas, mas apenas as isoformas básicas miotóxicas. Nesta linha, muitos estudos ainda precisam ser realizados com as enzimas ácidas, para melhor entender sua participação no processo inflamatório provocado por envenenamentos, uma vez que os danos locais são de grande importância, pois a soroterapia convencional combate com maior efetividade os efeitos sistêmicos do envenenamento.

Serrano e colaboradores (1999) demonstraram que uma PLA$_2$ da peçonha de *B. jararaca* inibe a agregação plaquetária, mas tem um efeito mínimo sobre a formação de edema. Os dados obtidos com a peçonha de *B. jararaca* tratados com p-BPB sugerem que a PLA$_2$ responsável pela degradação do AA, que vai resultar na produção de prostaglandinas e leucotrienos, é originada no tecido inflamado e não a partir do peçonha em si. Outras duas possibilidades poderiam ser que: (i) a atividade residual após o tratamento com p-BPB foi suficiente para induzir este edema ou (ii) que esse efeito não depende da atividade enzimática da toxina, como no caso de algumas metaloproteases.

Outros trabalhos foram publicados onde podemos encontrar diversos ensaios na tentativa de melhor entender o desenvolvimento do processo inflamatório por parte das

peçonhas de serpentes. Estudos como avaliação da hiperalgesia (TEIXEIRA et al., 1994; CHACUR et al., 2001, 2003), participação dos leucócitos (CURY; TEIXEIRA; SUDO, 1994; FARSKY et al., 1997; ZAMUNER; TEIXEIRA, 2002; TEIXEIRA et al., 2003a), participação dos corticosteróides na inflamação aguda induzida por peçonhas de serpentes (CURY; TEIXEIRA; FARSKY, 1997), degranulação de mastócitos, (CHOI et al., 1989; LANDUCCI et al., 1998; MORENO et al., 1992; GALVÃO-NASCIMENTO et al., 2010), quimiotaxia para células endoteliais (RIZZO et al., 2000), indução de edema (LOMONTE; TARKOWSKI; HANSON, 1993; LLORET e MORENO, 1993; GALVÃO DO NASCIMENTO, et al., 2010; WEI et al., 2009), participação de diversas citocinas no processo inflamatório (ZAMUNER e TEIXEIRA, 2002; TEIXEIRA et al., 2005; CHAVES; TEIXEIRA; GUTIÉRREZ, 2005) e participação das ciclooxigenases (OLIVO, et al., 2007).

5.2. Clonagem e expressão da enzima recombinante

A biologia molecular tem oferecido importantes ferramentas para os estudos da composição de peçonhas de serpentes. O proteoma e o transcriptoma de diversas glândulas de peçonhas ja foram estudados (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO e HO, 2002; KASHIMA et al., 2004; WAGSTAFF e HARRISON, 2006; CIDADE et al., 2006; CHING et al., 2006; ZHANG et al., 2006; CALVETE, et al., 2007; PAHARI et al., 2007; KULKEAW et al., 2007).

Neste estudo todos os EST foram classificados de acordo com a homologia de sua estrutura primária com sequências conhecidas. As sequencias codificando para toxinas representaram cerca de 30% do total de sequências identificadas. Diversas serpentes já tiveram seu transcriptoma estudado, como *Bothrops jararaca* (77,6%) (CIDADE, et al., 2006), *Deinagkistrodon acutus* (50,2%) (ZHANG et al., 2006), *Echis ocellatus* (57%) (WAGSTAFF e HARRISON, 2006), *Bothrops atrox* (59,4%) (Neiva et al., 2009), *Bothrops insularis* (67%) (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO e HO, 2002), *Bothrops jararacussu* (71%) (KASHIMA et al., 2004), *Sistrurus catenatus edwardsii* (77%) (PAHARI et al., 2007) e *Bothrops alternatus* (30%) (CARDOSO et al., 2011).

De acordo com o transcriptoma, as toxinas mais expressas pela glândula da serpente *Bothrops moojeni* são as metaloproteases (SVMP), as quais correspondem a 77% da peçonha. Este resultado está de acordo com resultados já divulgados, onde as SMVP correspondem à maior porção da peçonha (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO e HO, 2002; CIDADE et al., 2006; CARDOSO et al., 2011). A única exceção até o momento é a serpente *Bothrops jararacussu,* em que as PLA_2s representaram a maior porção da peçonha (KASHIMA et al., 2004).

De acordo com esses dados, podemos concluir que a biblioteca de cDNA da glândula de peçonha da serpente *B. moojeni* (Fig. 8) apresentou um resultado condizente com o de outras serpentes botrópicas já estudadas.

Na tentativa de encontrar um método alternativo ao isolamento e à purificação de proteínas de peçonhas de serpentes, foi realizada a amplificação e clonagem do cDNA isolado da glândula de peçonha da serpente *B. moojeni,* que apresenta um gene com 414 pares de bases. Este gene codifica uma proteína de 138 resíduos de aminoácidos, com massa molar e ponto isoelétrico teóricos de 13.927,5 Da e 4,9, respectivamente. A expressão heteróloga deste gene foi realizada em *E. coli*, como corpos de inclusão, seguida de renaturação da proteína à sua estrutura nativa, conforme já observado em vários trabalhos (CHANG; WU; CHANG 1996; WARD et al., 2001; YANG et al., 2003; ROBERTO et al., 2004; SETO et al., 2008). A proteína recombinante demonstrou a mesma sequência de aminoácidos, atividade fosfolipásica e efeito inibitório sobre plaquetas, observados para a proteína nativa BmooPLA$_2$, sugerindo que a recPLA$_2$ foi eficientemente expressa, purificada e enovelada.

Uma análise comparativa entre as proteínas nativa e recombinante foi realizada a fim de averiguar a atividade da enzima recombinante após os passos de expressão e redobramento. Tanto a BmooPLA$_2$ nativa quanto a recombinante, foram capazes de hidrolisar fosfolipídeos fluorescentes como NBD-PC, NBD-PG, NBD-PA e NBD-PE com afinidade diferenciada, mostrando-se mais ativas sobre NBD-PC (Fig. 11A), assim como observado nos trabalhos realizados com as fosfolipases A$_2$ ácidas, BpPLA$_2$ e BmooTX-I, purificadas a partir das peçonhas de *B. pauloensis* e *B. moojeni*, respectivamente (RODRIGUES et al., 2007; SANTOS-FILHO et al., 2008). Podemos verificar neste estudo que a atividade da enzima recombinante é semelhante à da nativa, indicando que após a expressão e redobramento, a proteína estava ativa, à semelhança do obtido em outros trabalhos (ROBERTO et al., 2004; SETO et al., 2008).

O efeito sobre plaquetas também foi testado, sendo que tanto a BmooPLA$_2$ nativa quanto a recombinante foram capazes de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP, de maneira dose-dependente (Fig. 11B).

A expressão de proteínas recombinantes tornou-se uma importante ferramenta no auxílio do estudo da relação estrutura-função das PLA$_2$s. Diversos experimentos desse tipo têm sido realizados na tentativa de melhor entender a relação estrutura-função das PLA$_2$s de peçonhas de serpentes (CHANG; WU; CHANG, 1996; LIZANO et al., 2001; WARD et al., 2001; YANG et al., 2003). Contudo, o elevado número de pontes de dissulfeto torna-se um grande obstáculo no estudo das PLA$_2$s recombinantes, devido a simplicidade dos modelos

utilizados para a expressão. A seleção do método adequado para a expressão dessas proteínas é por tentativa e erro. É um tanto difícil prever se uma proteína será expressa na quantidade desejada, se será solúvel, se possuirá a atividade desejada e se será de fácil purificação. A técnica de expressão de PLA_2s mais difundida é através da utilização de *E. coli*, sendo a expressão feita em corpos de inclusão. Após a expressão, a enzima é submetida a processos de renaturação (CHANG; WU; CHANG, 1996; WARD et al., 2001; YANG et al., 2003). As proteínas obtidas por esse processo podem apresentar uma baixa atividade biológica, causada provavelmente devido a um enovelamento inadequado da mesma.

Os estudos moleculares proporcionam vias alternativas de produção em maior quantidade da proteína clonada, a qual representa apenas cerca de 2-3% da peçonha total, auxiliando também na manutenção da integridade do meio ambiente. Estes estudos também permitem compreender o mecanismo de ação e a função biológica destes compostos, uma vez que estes assumem estruturas tridimensionais constituídas por diferentes domínios funcionais.

A expressão de PLA_2s de peçonhas de serpentes em *E. coli* é uma tarefa difícil, uma vez que essas podem causar a lise desses organismos, além do já citado elevado número de pontes de dissulfeto, que podem não ser corretamente realizadas. A maioria das PLA_2s é liberada na forma de corpos de inclusão quando expressas em *E. coli* (OGAWA et al., 1997; CHIOATO e WARD, 2003) . Esses corpos de inclusão são de fácil separação por centrifugação, mas as proteínas em corpos de inclusão devem ser desnaturadas e reenoveladas quimicamente. Apesar de as condições de desnaturação serem otimizadas para proteínas específicas, a taxa de renaturação é geralmente baixa (SETO et al., 2008). Desse modo, a eficiência desse sistema de expressão ainda deve ser melhorada, a fim de se conseguir, com maior facilidade, uma enzima recombinante ativa.

Futuros estudos farmacológicos e estruturais poderão auxiliar na confirmação de hipóteses baseadas na relação estrutura-função das PLA_2s e fornecer, também, informações relevantes para o desenvolvimento de drogas e produtos biotecnológicos utilizados na pesquisa biomédica.

As PLA_2s isoladas de peçonhas de serpentes são proteínas multifuncionais que apresentam um grande potencial biotecnológico de aplicação na clínica-médica, assim como mostram ser excelentes modelos para se estudar diferentes mecanismos de ação intra e extra-celulares destas enzimas com seus tecidos/moléculas alvo. Além disso, o isolamento e a expressão de uma enzima recombinante funcional pode ser o primeiro passo para poupar espécies ameaçadas de extinção. Pois uma vez que as proteínas de interesse poderiam ser "sintetizadas", não haveria mais a necessidade da extração da peçonha.

5.3. Ensaios sobre inflamação

As fosfolipases A_2 secretadas, do grupo IIA, ao qual pertencem as PLA_2s de peçonha das serpentes da família Viperidae, são reconhecidas como elementos importantes do processo inflamatório, por favorecerem a produção de prostanóides, pela capacidade de liberarem ácido araquidônico (PRUZANSKI e VADAS, 1991). No entanto, os efeitos destas proteínas, sobre outras etapas das vias biossintéticas de prostanóides, são pouco conhecidos, principalmente das isoformas ácidas e não tóxicas.

No presente trabalho, foi investigada, inicialmente, a capacidade das enzimas $BmooPLA_2$ nativa e recombinante de induzirem a liberação de prostaglandinas *in vitro*. Os resultados demonstraram que a proteína nativa induziu apenas a liberação de PGE_2 (Fig. 12A), enquanto que a proteína recombinante induziu a liberação dos três eicosanóides avaliados, prostaglandina E_2 (PGE_2), tromboxana B_2 (TXB_2) e leucotrieno B_4 (LTB_4) (Figs. 12A, B e C).

Na literatura disponível atualmente podemos encontrar atividades semelhantes, porém apenas com as isoformas básicas. Pode-se constatar que fosfolipases como MT-II e MT-III de *Bothrops asper* liberam outros eicosanóides *in vivo*, como a tromboxana A_2 (TXA_2) e o leucotrieno B4 (LTB_4) (ZULIANI et al. 2005a) e que uma $sPLA_2$ da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* libera LTB_4, lipoxina e PGE_2 (SAMPAIO et al., 2006).

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que a atividade catalítica da toxina avaliada pode não ser importante para a indução de prostanóides, uma vez que a $BmooPLA_2$ tem atividade catalítica sobre substratos artificiais e não demonstrou atividade sobre a liberação de todos os prostanóides aqui avaliados. No entanto, a natureza catalítica da toxina pode ter favorecido a produção de PGE_2. A PGE_2 assim como a PGD_2 têm ação vasodilatadora e a PGE_2 pode potenciar o aumento da permeabilidade vascular, promovido por alguns mediadores deste fenômeno, com consequente formação de edema (GERRITSEN, 1996). Como já observado para outras PLA_2s, MT-II e MT-III de *B. asper* e as $sPLA_2$s isoladas da peçonha de *C. d. terrificus*, elas induzem, experimentalmente, resposta edematogênica e promovem o aumento da permeabilidade vascular (CHAVES et al., 1998; LANDUCCI et al., 2000a; CÂMARA et al., 2003; ZULIANI et al., 2005a), sendo possível sugerir que a PGD_2 e a PGE_2 estejam envolvidas nesses efeitos.

O papel das prostaglandinas em processos inflamatórios não depende somente da sua concentração no local de lesão e da interação com outros mediadores liberados, mas também do perfil de receptores, presentes em leucócitos e células adjacentes, e das respectivas vias de sinalização (TILLEY et al., 2001). Assim, a partir do conhecimento de que as prostaglandinas E_2 e D_2, liberadas pela ação das PLA_2s, podem se ligar a uma variedade de receptores e

desencadear eventos inflamatórios ou não, estudos futuros deverão mostrar a contribuição desses mediadores para os efeitos dessas $sPLA_2$s.

Para outros mediadores inflamatórios avaliados, TXB_2 e LTB_4 e, a $BmooPLA_2$ nativa não demonstrou uma atividade significativa ($p > 0,05$ - Figs. 12B e C), enquanto que a enzima recombinante apresentou uma atividade significativamente maior ($p < 0,05$) (Figs. 12A, B, e C).

Uma série de mediadores inflamatórios, liberados na cavidade peritoneal, após injeção das toxinas, pode ser responsável pelo recrutamento de leucócitos. Há relatos na literatura que demonstram um aumento acentuado na concentração de LTB_4 e TXB_2 na cavidade peritoneal como consequência da injeção de PLA_2s de peçonhas de serpentes (ZULIANI et al., 2005a).

Gambero e colaboradores, (2002) demonstraram que alta concentração de Piratoxina-I, uma PLA_2 Lys49, e Bothropstoxina-II, uma PLA_2 Asp49, induziram quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* e sugeriram que esse efeito está associado ao LTB_4. Este eicosanóide é um dos agentes quimiotáticos mais potentes para leucócitos PMN. A interação deste eicosanóide com o seu receptor na superfície dos neutrófilos resulta em quimiotaxia, quimiocinese, agregação e adesão às células endoteliais (HOOVER et al., 1984; PALMBLAD et al., 1990).

As tromboxanas A_2 também são agentes quimiotáticos importantes no processo inflamatório. A não liberação deste mediador pela $BmooPLA_2$ sugere que a atividade catalítica desta PLA_2 não é responsável por esse processo de mediação. Diferente do que foi observado para a MT-III, de *B. asper*, onde a atividade catalítica desta PLA_2 desempenha um papel neste processo de mediação, provavelmente devido à hidrólise direta de fosfolipídios da membrana, com a consequente liberação de ácido araquidônico e o aumento de vias biossintéticas envolvidas na produção de eicosanóides. Em adição ao efeito enzimático, pode ser que a MT-III seja capaz de interagir com as células, ativando PLA_2s da classe IV intracelulares e, provavelmente, induzindo a expressão de formas endógenas de PLA_2s secretadas das classes II ou V, as quais tem demonstrado um papel relevante na síntese de eicosanóides (ZULIANI et al., 2005a).

A seguir, foi avaliada a capacidade das toxinas em induzir a expressão de COX-2. A literatura mostra que a expressão de COX-2 é dependente da ativação transcricional, induzida por mediadores pró-inflamatórios (WU, 2005). A região promotora do gene da proteína de COX-2 é regulada por vários elementos transcripcionais, como o CREB, AP2, SP1, NF-IL6 e NF-κB (YAMAMOTO et al., 1995; SCHMEDTJE et al., 1997; D`AQUISTO et al., 1997; ABATE e SCHRÖDER, 1998). Dentre estes elementos, o NF-IL6 e o NF-κB regulam positivamente a transcrição do gene de COX-2 (YAMAMOTO et al., 1995). O fator de

transcrição nuclear κB (NF-κB) é o principal fator de transcrição envolvido na expressão da COX-2 e exerce um papel fundamental em respostas imunológicas e inflamatórias (WU et al., 2003). Além disso, o NF-κB regula outros genes, que codificam outras proteínas que participam de processos inflamatórios (BARNES; KARIN, 1997).

Considerando o que está descrito na literatura para PLA_2s destituídas de atividade enzimática, a produção de AA não parece ser relevante para o desencadeamento das ações estimulantes da via do NF-κB e expressão de COX-2. A perturbação de membranas celulares via interação com receptores específicos, ou não, para o desencadeamento da sinalização intracelular, responsável pelos efeitos destas miotoxinas, é uma hipótese provável, que deve ser investigada (MOREIRA, 2008). Segundo KINI e EVANS (1989; 1995), em mecanismos independentes de atividade catalítica, a ligação das $sPLA_2$s às regiões aceptoras pode causar o efeito farmacológico por ações do tipo agonista ou antagonista, ou por interferência na interação das proteínas alvo com seus ligantes fisiológicos.

Diferente do observado para isoformas básicas (MOREIRA et al., 2008) e apesar da atividade enzimática elevada, a $BmooPLA_2$ nativa não demonstrou uma atividade significativa sobre a expressão de COX-2 (Fig, 14D). Enquanto que a PLA_2 recombinante induziu a expressão nos tempos de 3 e 24 h (Fig. 14B e C). Em mecanismos dependentes da atividade enzimática, tanto a hidrólise de fosfolipídios quanto a liberação de produtos, como ácidos graxos livres, podem causar o efeito farmacológico. A atividade catalítica pode causar alterações da membrana celular e afetar a natureza da interação proteína-membrana, particularmente em sítios aceptores (proteínas alvo). No entanto, alguns efeitos farmacológicos devem-se a combinações de ambos os mecanismos, enzimático e não enzimático (KINI; EVANS, 1995). Considerando que a COX-1 é uma enzima constitutiva e que relatos na literatura demonstram que a sua expressão não é alterada na presença de peçonha de serpente do gênero *Bothrops* (MOREIRA et al., 2009) e, além disso, que a quantidade de amostra era reduzida, optou-se neste trabalho em fazer a dosagem apenas da COX-2.

Nos estudos sobre inflamação aqui realizados, obtivemos uma atividade diferente da esperada para a proteína recombinante (Figs. 12 e 14). Uma vez que nos ensaios realizados para a caracterização funcional, não obtivemos diferença, era esperado que nos ensaios de inflamação as duas proteínas se comportassem da mesma maneira. Uma possível causa para essa diferença é a presença de lipopolissacarídeo (LPS), já que o sistema utilizado para a expressão da proteína recombinante foi *E. coli*. Hipótese esta que tentaremos averiguar.

O LPS é frequentemente utilizado como controle positivo para ensaios de inflamação, devido a sua capacidade de induzir a expressão da enzima COX2. Conforme observamos na figura 14, onde pudemos observar uma maior indução da produção de COX2 pela enzima recombinante, o que pode ser um indício da presença desse contaminante.

Deste modo, alguma falha no processo de purificação da proteína recombinante pode ter resultado na presença de LPS na amostra, causando uma interferência nos resultados (TEIXEIRA, C.F, comunicação pessoal, 2009). Portanto, estudos futuros com novas amostras da enzima nativa e recombinante se fazem necessários para esclarecer o possível mecanismo de ação desta PLA_2 ácida sobre a inflamação.

Os dados aqui apresentados são inéditos e contribuem para um melhor conhecimento dos mecanismos de ação das $sPLA_2$s de peçonhas da família Viperidae e, em última análise, de PLA_2s secretadas, do grupo IIA. Os conhecimentos adquiridos com os estudos detalhados das ações específicas das PLA_2s, a exemplo das atividades aqui investigadas, permitirão que estas enzimas se tornem ferramentas úteis para o estudo de mecanismos e funções celulares específicas e/ou de agentes anti-inflamatórios.

5.4. Caracterização Estrutural

Comparando as estruturas primárias de diferentes PLA_2s ácidas de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*, verificou-se uma alta similaridade entre as mesmas. As diferenças observadas resultam em alterações no ponto isoelétrico das proteínas e também em suas atividades biológicas. No caso das isoformas Lys49, a miotoxicidade parece estar relacionada à presença de alguns sítios catiônicos na região C-terminal (resíduos 108 em diante) (DÍAZ et al., 1994; LOMONTE et al., 2010). Já para as toxinas Asp49, a região C-terminal parece não ser a única responsável por essa atividade. Para a BmooTX-I (SANTOS-FILHO et al., 2008), uma Asp49 ácida, com atividade miotóxica, observa-se que quando modificada com brometo de p-bromofenacila (p-BPB), ela perde parcialmente sua atividade miotóxica, sugerindo que esta atividade pode estar relacionada com outra região, além do *loop* C-terminal e do sítio catalítico, uma vez que as duas regiões são extremamente conservadas tanto na $BmooPLA_2$ quanto na BmooTX-I.

Confirmando o estudo de homologia entre os resíduos da região N-terminal, as PLA_2s ácidas de serpentes analisadas apresentaram também elevada similaridade na análise da sua estrutura primária com a da $BmooPLA_2$: $BpirPLA_2$-I: 87% (*Bothrops pirajai*), BE-I-PLA_2: 86% (*B. erythromelas*), BinTX-I: 81% (*B. insularis*), BthA-I-PLA_2: 80% (*B. jararacussu*), BJ-PLA_2: 79% (*B. jararaca*) e $BaspPLA_2$-II: 77% (*B. asper*).

Além disso, podemos observar que estas enzimas possuem alguns domínios comuns, incluindo 14 resíduos de cisteína e os aminoácidos His48, Asp49, Tyr52 e Asp99 (considerados importantes para a atividade catalítica).

Como esperado, o modelo tridimensional da BmooPLA$_2$ (Fig. 16A) apresentou as estruturas básicas dessa classe de proteínas (CORREA et al., 2006; MARCHI-SALVADOR et al., 2008, 2009; DOS SANTOS et al., 2009) como, por exemplo, o sítio ativo formado pelos resíduos His48, Asp49, Tyr52, e Asp99, encontrados nas alfa-hélices ‘‘h2’’ e ‘‘h3’’. Localizada entre a região conhecida como folhas beta e o sítio catalítico, encontra-se a alfa-hélice N-terminal (h1, resíduos 1-12), a qual está envolvida na interação entre o sítio ativo e o substrato, através de um canal hidrofóbico. Próximo ao sítio calalítico, está localizado o loop ligante de cálcio, formado pelos resíduos (C27XCGXGG33) (ARNI e WARD 1996), sendo esta numeração de acordo com Renetseder et al. (1985). Na figura 16C, podemos observar que a estrutura predita da BmooPLA$_2$ está condizente com estrutura de outras PLA$_2$ já descritas e obtidas experimentalmente, sendo uma delas uma toxina básica Lys49.

Tratando-se das isoformas Lys49 a região C-terminal é composta por uma combinação de resíduos predominantemente catiônicos e hidrofóbicos. Esta composição pode explicar a capacidade desta região de interagir e penetrar nas camadas lipídicas das membranas celulares, uma propriedade relacionada com a atividade miotóxica dessas toxinas. Já nas PLA$_2$s Asp49, a região C-terminal é composta predominantemente por resíduos hidrofílicos e aniônicos (OGAWA et al., 1996; VALENTIN e LAMBEAU 2000; LOMONTE et al., 2003; OHNO et al., 2003; DOS SANTOS et al., 2009; TEIXEIRA et al. ,2011). Foi proposto por Dos Santos e colaboradores (2009) que o sítio miotóxico das isoformas Lys49, seria constituído por quarto resíduos (K20, K115, R118 e Y119), três dos quais localizados na região C-terminal. A toxina isolada no presente trabalho, possui diferentes resíduos no sítio miotóxico (N115, W118, F119), podendo ser esta uma explicação para a ausência da atividade miotóxica da BmooPLA$_2$.

Os testes iniciais de cristalização (Figs. 17 e 18) foram realizados com 50 soluções precipitantes previamente determinadas (soluções comerciais “Screen I” *Hampton Research* – Laguna Miguel, CA, USA). Analisando os resultados obtidos nos testes iniciais, diversas soluções precipitantes se destacaram e foram otimizadas através de sucessivas alterações da concentração de seus agentes precipitantes – método de matriz esparsa (JANCARIK; KIM, 1991). Estes estudos foram apenas preliminares. A cristalização completa foi realizada pelo grupo do Prof. Dr. Marcos R. M. Fontes (UNESP – Botucatu) e será publicada em breve.

Poucos estudos já foram publicados com PLA_2s ácidas de peçonhas de serpentes brasileiras (FULY et al., 1997; 2000; SERRANO et al., 1999; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; KETELHUT et al., 2003; ROBERTO et al., 2004a, b ; MAGRO et al., 2003; 2005; COGO et al., 2006; MODESTO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007, SANTOS-FILHO et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2011). A aquisição de informações adicionais irá contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos de ação destas enzimas individualmente e da sua participação em envenenamentos ofídicos.

Estudos funcionais e estruturais sobre estas enzimas ainda são necessários, a fim de elucidar os mecanismos de ação de PLA_2s ácidas isoladas de peçonhas de serpentes, uma vez que a sua atividade enzimática não parece ser o fator determinante da toxicidade. A caracterização bioquímica de PLA_2s ácidas presentes em peçonhas pode também resultar na compreensão da relação estrutura-função destas enzimas.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

Concluindo, a $BmooPLA_2$ é uma enzima ácida isolada da peçonha de *B. moojeni,* pertencente ao subgrupo Asp49 das PLA_2s, as quais fazem parte do grupo IIA, de acordo com a atual classificação das $PLA2_s$. A proteína isolada, apresentou uma única cadeia polipeptídica, pI~5,2, se mostrou rica em aminoácidos hidrofóbicos, ácidos, além de 14 resíduos de cisteína. Esta isoforma pH-termoestável apresentou alta atividade fosfolipásica. Também foi observado a indução de edema moderado *in vivo*, na concentração de 25 µg. Além disso, a $BmooPLA_2$ foi capaz de inibir a agregação plaquetária de modo dose dependente e induziu efeito hipotensor nas concentrações de 15 e 30 µg. A biblioteca de cDNA da glândula de peçonha da serpente *Bothrops moojeni* também foi construída, onde o cDNA que codifica a proteína $BmooPLA_2$ foi clonado e a proteína recombinante expressa em *E. coli*. As sequencias codificando para toxinas representaram cerca de 30% do total de sequências identificadas. De acordo com o transcriptoma, as toxinas mais expressas pela serpente *Bothrops moojeni* são as metaloproteases (SVMP), as quais correspondem a aproximadamente 77% das toxinas encontradas. A proteína recombinante apresentou a mesma sequência de aminoácidos, atividade fosfolipásica e efeito inibitório sobre plaquetas, observados para a proteína nativa, sugerindo que a $recBmooPLA_2$ foi expressa, purificada e reenovelada em sua forma ativa. As toxinas nativa e recombinante foram avaliadas quanto ao seu efeito sobre a resposta inflamatória (ensaios sobre leucócitos *in vitro*), avaliando a expressão da enzima COX-2 e liberação do prostanóide PGE2, além de outros mediadores como TXB4 e LTB2, após a incubação com macrófagos isolados, *in vitro*. Com estes resultados, podemos esperar que a $BmooPLA_2$ possa contribuir para futuros estudos envolvendo hipertensão e inibição de agregação plaquetária, podendo dar origem até a medicamentos para esses fins, baseados na estrutura dessa toxina.

A construção da biblioteca de cDNA deixa informações importantes sobre a composição desta peçonha, bem como uma fonte de pesquisa para diversos estudos que podem utiliza-la como base.

A expressão de toxinas recombinantes é de grande valia uma vez que, possibilita a obtenção de maiores quantidades dessas toxinas, facilitando seu estudo. Entretanto, esses procedimentos ainda não foram totalmente otimizados, motivo pelo qual, diversos outros protocolos estão sendo estudados na tentativa de se conseguir resultados mais eficientes.

7. Referências

7. REFERÊNCIAS*

ABATE, A.; SCHRÖDER, H.; Protease inhibitors protect macrophages from lipopolysaccharide-induced cytotoxicity: possible role for NF-kB. **Life Sci.,** v. 62, p. 1081- 1088, 1998.

ABREU, V. A.; DAL BELO, C. A.; HERNANDES-OLIVEIRA, S. S.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; HYSLOP, S.; FURTADO, M. D. E. F.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis, B. n. paranaensis and B. n. diporus*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 148A(1), p. 142-9, 2007.

ADAMS, M. D.; KELLEY, J. M.; GOCAYNE, J. D.; DUBNICK, M.; POLYMEROPOULOS, M. H.; XIAO, H.; MERRIL, C. R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R. F. ET AL. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science,** v. 252(5013), p. 1651-6, 1991.

AKAO, P. K.; TONOLI, C. C.; NAVARRO, M. S.; CINTRA, A. C.; NETO, J. R.; ARNI, R. K.; MURAKAMI, M. T. Structural studies of BmooMPalpha-I, a non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. **Toxicon**, v. 55(2-3), p. 361-8, 2010.

AMARAL, C. F. S.; SILVA, O. A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. **Toxicon,** v. 23, p. 877-885, 1985.

ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**. v. 38(6), p. 775-91, 2000.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R.; FULY, A. L.; CORREA, F. M.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A_2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochem. Pharmacol.,** v. 64(4), p. 723-732, 2002.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANGULO, Y.; DIAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Myotoxic phospholipases A_2 in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82(8), p. 755−763, 2000.

* Referências Bibliográficas de acordo com a norma NBR 6023 da Associação Brasileira de Nórmas Técnicas (ABNT)

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A_2-a structural review. **Toxicon**, v. 34(8), p. 827-41, 1996.

AZAM, A; PAUL, J.; SEHGAL, D.; PRASAD, J.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, A. Identification of novel genes from *Entamoeba histolytica* by expressed sequence tag analysis. **Gene,** v. 181(1-2), p. 113-6, 1996.

BAILEY P., WILCE J. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emerg. Med.**, v. 13, p. 28-36, 2001.

BARKER, R. A.; RATCLIFFE, E.; MCLAUGHLIN, M.; RICHARDS, A.; DUNNETT, S. B. A role for complement in the rejection of porcine ventral mesencephalic xenografts in a rat model of Parkinson's disease. **J. Neurosci.,** v. 20, p. 3415–24, 2000.

BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N. Engl. J. Med.,** v. 336, p. 1066-1071, 1997.

BARRAVIEIRA, B. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops, Lachesis* e *Micrurus.* **Arq Bras Med.** v. 65, p. 345-355, 1991.

BAZAA, A.; MARRAKCHI, N.; EL AYEB M.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake venomics: Comparative analysis of the venos proteomes of the Tunisian snakes *Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera* and *Macrovipera lebetina*. **Proteomics**, v 5 p. 4223-4235, 2005.

BAZAA, A;. LUIS, J.; SRAIRI-ABID, N.; KALLECH-ZIRI, O.; KESSENTINI-ZOUARI, R.; DEFILLES, C.; LISSITZKY, J. C.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N. MVL-PLA_2, a phospholipase A_2 from *Macrovipera lebetina* transmediterranea venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. **Matrix Biol.** v. 28(4), p. 188-93, 2009.

BERGFORS, T. M. **Protein Crystallization. Techniques, Strategies and Tips**. 1999, 306p.

BERNARDES, C. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; COSTA, T. R.; GOMES, M. S.; TORRES, F. S.; COSTA, J.; BORGES, M. H.; RICHARDSON, M.; DOS SANTOS, D. M.; DE CASTRO PIMENTA, A. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOARES, A. M.; DE OLIVEIRA, F. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 51(4), p. 574-84, 2008.

BIDGOOD, M. J.; JAMAL, O. S.; CUNNINGHAM, A. M.; BROOKS, P. M.; SCOTT, K. F. Type IIA secretory phospholipase A_2 up-regulates cyclooxygenase-2 and amplifies cytokine- mediated prostaglandin production in human rheumatoid synoviocytes. **J. Immunol.,** v. 165(5), p. 2790-2797, 2000.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, R. S.; FONSECA, F. P.; MENALDO, D. L.; FERREIRA, F. B.; HENRIQUE-SILVA, F.; SOARES, A. M.; HAMAGUCHI, A.; RODRIGUES, V. M.; OTAVIANO, A. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile. **Biochimie**, v. 91(5), p. 586-95, 2009.

BON, C.; BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M.S.; LAMBEZAT, M. P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A_2 neurotoxin. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.,** v. 39, p. 439–48, 1989.

BON, C. Multicomponent neurotoxic phospholipases A_2. In: Kini RM; editor. Venom phospholipase A_2 enzymes: structure; function and mechanism. England: John Wiley and Sons Ltd.; p. 269-85. 1997.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A_2 biochemistry. **Cardiovasc. Drugs Ther**. v. 23(1), p. 49-59, 2009.

CÂMARA, P. R. S.; ESQUISATTO, L. C. M.; CAMARGO, E. A.; RIBELA, M. T. C. P.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Inflammatory oedema induced by phospholipase A_2 isolated from *Crotalus durissus sp.* in the rat dorsal skin: a role for mast cell and sensory C-fibers. **Toxicon**, v. 41, p. 823–29, 2003.

CALVETE, J. J.; MORENO-MURCIANO, M. P.; THEAKSTON, R. D.; KISIEL, D. G.; MARCINKIEWICZ, C. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochem. J.,** v. 372, p. 725–34, 2003.

CALVETE, J.J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **J. Mass Spectrom.,** v. 42, p. 1405-1414, 2007.

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; SANZ, L. Snake venomics of *Bitis gabonica* gabonica. Protein family composition, subunit organization of venom toxins, and characterization of dimeric disintegrins bitisgabonin-1 and bitisgabonin-2. **J. Proteome Res.,** v. 6(1), p. 326-36, 2007.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. The venomous Reptiles of Latin America. New York: Cornell University, 1989.

CARDOSO, K. C.; DA SILVA, M. J.; COSTA, G. G.; TORRES, T. T.; DEL BEM, L. E.; VIDAL, R. O.; MENOSSI, M.; HYSLOP, S. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics,** v. 11, p. 605, 2010.

CHANG, C. C.; SU, M. J. Presynaptic toxicity of the histidine-modified, phospholipase A_2-inactive, beta-bungarotoxin, crotoxin and notexin. **Toxicon,** v. 20, p.895-905, 1982.

CHANG, L.S.; WU, P.F.; CHANG, C.C. Expression of Taiwan banded krait phospholipase A_2 in *Escherichia coli*, a fully active enzyme generated by hydrolyzing with aminopeptidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 225(3), p.990-6, 1996.

CHACUR, M.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon,** v. 39, p. 1173-1181, 2001.

CHACUR, M.; LONGO, I.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; GUERRA, J. L.; TEIXEIRA, C. F.; CURY, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A_2 from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. **Toxicon**, v. 41, p. 667–78, 2003.

CHAVES, F.; BARBOSA, M.; GUTIERREZ, J. M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo) in mice. **Toxicon,** v. 33, p. 31-39, 1995.

CHAVES, F.; LEON, G.; ALVARADO, V. H.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A_2 isolated from the venom of snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 36, p. 1861–69, 1998.

CHAVES, F.; TEIXEIRA, C. F.; GUTIÉRREZ, J. M. Role of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. **Toxicon**, v. 45(2), p. 171-8, 2005.

CHING, A. T. C.; ROCHA, M. M.; PAES LEME, A. F.; PIMENTA, D. C.; DE FATIMA D FURTADO, M.; SERRANO, S. M.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. Some aspects of the venom proteome of the Colubridae snake *Philodryas olfersii* revealed from a Duvernoy's (venom) gland transcriptome. **FEBS Letters**, v. 580, p. 4417-4422, 2006.

CHIOATO, L.; WARD, R. J. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A_2 by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon**, v. 42(8), p. 869-83, 2003.

CHOI, S. H.; SAKAMOTO, T.; FUKUTOMI, O.; INAGAKI, N.; MATSUURA, N.; NAGAI, H.; KODA, A. Pharmacological study of phospholipase A_2-induced histamine release from rat peritoneal mast cells. **J. Pharmacobiodyn.**, v. 12(9), 517-22, 1989.

CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; BRIDGES, M.; MURPHY, G. F.; ALBELDA, S. M.; DELISSER, H. M. Expression and function of endothelial cell alpha v integrin receptors in wound-induced human angiogenesis in human skin/SCID mice chimeras. **Am. J. Pathol.**, v. 151(4), p. 975-83, 1997.

CIDADE, D. A. P.; SIMAO, T. A.; DAVILA, A. M.; WAGNER, G.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; HO, P. L.; BOM, C.; ZINGALI, R. B.; ALBANO, R. M.; *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: Analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**, v. 48, p. 437-461, 2006.

COGO, J. C.; LILLA, S.; SOUZA, G. H.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A_2 from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochimie,** v. 88(12), p. 1947-59, 2006.

COREY, E. J.; NIWA, H.; FALCK, J. R.; MIOSKOWSKI, C.; ARAI, Y.; MARFAT, A. Recent studies on the chemical synthesis of eicosanoids. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.**, v. 6, p. 19-25, 1980.

CORRÊA, L. C.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; CINTRA, A. C.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Preliminary X-ray crystallographic studies of BthTX-II, a myotoxic Asp49-phospholipase A_2 with low catalytic activity from *Bothrops jararacussu* venom. **Acta Crystallogr.,** v. 62(8), p. 765-7, 2006.

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 A_2 isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides,** v. 29, p. 1645-1656, 2008.

CROCKETTI-TORABI, E. Selectins and mechanisms of sinal transduction. **J. Leukoc. Biol.**, v. 63(1), p. 1–14, 1998.

CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F.; SUDO, L. S. Edematogenic responses induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of lymphocytes. **Toxicon,** v. 32(11), p. 1425-31, 1994.

D`AQUISTO, F.; IUVONE, T.; ROMBOLA, L.; SAUTEBIN, L.; DI ROSA, M.; CARNUCCIO, R. Involvement of NF-κB in regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. **FEBS Lett.,** v. 418, p. 175-178, 1997.

DE ALBUQUERQUE MODESTO, J. C.; SPENCER, P. J.; FRITZEN, M.; VALENCA, R. C.; OLIVA, M. L.; DA SILVA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; GUARNIERI, M. C. BE-I-PLA_2, a novel acidic phospholipase A_2 from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I2 release by endothelial cells**. Biochem. Pharmacol.,** v. 72(3), p.377-84, 2006.

DE OLIVEIRA, T.; DE AMORIM, H. L. N.; GUIMARÃES, J.A. Interfacial activation of snake venom phospholipases A_2 ($svPLA_2$) probed by molecular dynamics simulations. **J. Mol Struct. Theochem**., v. 818, p. 31–41, 2007.

DE PAULA, R. C.; CASTRO, H. C.; RODRIGUES, C. R.; MELO, P. A.; FULY, A. L. Structural and pharmacological features of phospholipases A_2 from snake venoms.. **Prot. Pept. Lett**. v.16(8), p. 899-907, 2009.

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, 2002.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A_2. **J. Biol. Chem.**, v. 269(18), p. 13057-60, 1994.

DESHIMARU, M.; OGAWA, T.; NAKASHIMA, K.; NOBUHISA, I.; CHIJIWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; NIWA, M.; YAMASHINA, I.; HATTORI, S.; OHNO, M. Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. **FEBS Lett.,** v. 397, p. 83–8, 1996.

DÍAZ, C.; ALAPE, A.; LOMONTE, B.; OLAMENDI, T.; GUTIÉRREZ, J.M. Cleavage of the NH2-terminal octapeptide of *Bothrops asper* myotoxin Lysine-49 phospholipase A_2 reduces its membrane destabilizing effect. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 312, p. 336-9, 1994.

DÍAZ-OREIRO, C.; GUTIÉRREZ, J.M. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A_2 isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. **Toxicon,** v.35, p. 241-252, 1997.

DIZ FILHO, E. B.; MARANGONI, S.; TOYAMA, D. O.; FAGUNDES, F. H.; OLIVEIRA, S. C.; FONSECA, F. V.; CALGAROTTO, A. K.; JOAZEIRO, P. P.; TOYAMA, MH. Enzymatic and structural characterization of new PLA_2 isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**, v. 53(1), p. 104-14, 2009.

DOS SANTOS, J. I.; FERNANDES, C. A.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. The intriguing phospholipases A_2 homologues: relevant structural features on myotoxicity and catalytic inactivity. **Prot. Pept. Lett.**, v. 16(8), p. 887-93, 2009.

ESPINO-SOLIS, G. P.; RIAÑO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Antidotes against venomous animals: state of the art and prospectives. **J. Proteomics,** v. 72(2), p. 183-99, 2009.

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**, v. 35(2), p. 185-93, 1997.

FERNÁNDEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M.; ÂNGULO, Y.; SANZ, L.; JUÁREZ, P.; CALVETE, J. J.; LOMONTE, B. Isolation of an acidic phospholipase A_2 from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: biochemical and toxicological characterization. **Biochimie,** v. 92(3), p. 273-83, 2010.

FOX, J. W.; MA, L.; NELSON, K.; SHERMAN, N. E.; SERRANO, S. M. Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. **Toxicon,** v. 47(6), p. 700-14, 2006.

FRANÇA, F. O. S. e MÁLAQUE, C. M. S. 2003. Acidente botrópico. Pp. 72-86 *In:* Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**.** Sarvier, São Paulo – SP.

FRANCISCHETTI, I. M.; MY-PHAM, V.; HARRISON, J.; GARFIELD, M. K.; RIBEIRO, J. M. *Bitis gabonica* (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. **Gene,** v. 337, p. 55-69, 2004.

FRY, B. G.; WUSTER, W.; RYAN RAMJAN, S. F.; JACKSON, T.; MARTELLI, P.; KINI, R. M. Analysis of Colubroidea snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxinological implications. **Rapid Commun. Mass Spectrom.,** v. 17, p. 2047–62, 2003.

FULY, A.; MACHADO, O. L.; ALVES, E. W.; CARLINI, C. R. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A_2 isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) venom. **Thromb. Haemost.,** v. 78(5), p. 1372-1380, 1997.

FULY, A. L.; CALIL-ELIAS, S.; ZINGALI, R. B.; GUIMARÃES, J. A.; MELO, P. A. Myotoxic activity of an acidic phospholipase A_2 isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Toxicon**, v. 38(7), p. 961-72, 2000.

FULY, A.L.; DE MIRANDA, A. L.; ZINGALI, R. B.; GUIMARAES, J. A. Purification and characterization of a phospholipase A_2 isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. **Biochem. Pharmacol.,** v. 63(9), p. 1589-1597, 2002.

FULY, A.L.; SOARES, A. M.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; GUIMARÃES, J. A. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A_2 isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie,** v. 86, p. 731-739, 2004.

GALLACCI, M.; CAVALCANTE, W. L. Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A_2 homologues. **Toxicon**, v. 55(1), p. 1-11, 2010.

GALVÃO DO NASCIMENTO, N.; SAMPAIO, M. C.; DO AMARAL OLIVO, R.; TEIXEIRA, C.F.P. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. **Toxicon.** v. 55(2-3), p. 343-52, 2010.

GAMBERO, A.; LANDUCCI, E. C.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; GIGLIO, J. R.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A_2: a role for cell surface glycosaminoglycans. **Biochem. Pharmacol.** v. 63(1), p. 65–72, 2002.

GARCIA-DENEGRI, M. E.; ACOSTA, O. C.; HUANCAHUIRE-VEJA, S.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S.; MARUÑAK, S. L.; TEIBLER, G. P.; LEIVA, L. C.; PONCE-SOTO, L. A. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA(2) Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. **Toxicon**, v. 56(1), p. 64-74, 2010.

GERRITSEN, M. E. Physiological and pathophysiological roles of eicosanóides in the microcirculation. **Cardiov. Res.,** v. 32, p. 720-32, 1996.

GOMES, M. S.; MENDES, M. M.; DE OLIVEIRA, F.; DE ANDRADE, R. M.; BERNARDES, C. P.; HAMAGUCHI, A.; DE ALCÂNTARA, T. M.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**. v. 53(1), p. 24-32, 2009.

GUIMARAES-GOMES, V.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; S DUTRA, D. L.; PUJOL-LUZ, M.; CASTRO, H. C.; HO, P. L.; ZINGALI, R. B. Cloning, characterization, and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. **Arch. Biochem. Biophys.,** v. 432(1), p. 1-11, 2004.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; CERDAS, L. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. **Toxicon**, v. 24(9), p. 885-94, 1986.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan,** v. 51, p. 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A_2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon,** v. 33(11), p. 1405-1424, 1995

GUTIÉRREZ, J. M. e OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A_2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon,** v. 42(8), p. 915-31, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; ANGULO, Y. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations**. Curr. Pharm. Des.** v. 13(28), p. 2935-50, 2007.

GUTIÉRREZ, J. M.; PONCE-SOTO, L. A.; MARAGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A_2: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA_2 homologue. **Toxicon**, v. 51, p. 80–92, 2008.

HABERMANN, E.; BREITHAUPT, H. The crotoxin complex – an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**, v. 16, p. 19–30, 1978.

HANASAKI, K.; ARITA, H. Biological and pathological functions of phospholipase A_2 receptor. **Arch. Biochem. Biophys.,** v. 372, p. 215-223, 1999.

HERNÁNDEZ, M.; FUENTES, L.; FERNÁNDEZ AVILÉS, F. J.; CRESPO, M. S.; NIETO, M. L. Secretory phospholipase A(2) elicits proinflammatory changes and upregulates the surface expression of fas ligand in monocytic cells: potential relevance for atherogenesis. **Circ. Res.,** v. 90(1), p. 38-45, 2002.

HIGUCHI, D. A.; BARBOSA, C. M.; BINCOLETTO, 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 A_2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie,** v. 89(3), p. 319-28, 2007.

HOOVER, R. L.; KARNOVSKY, M. J.; AUSTEN, K. F.; COREY, E. J.; LEWIS, R. A. Leukotriene B4 action on endothelium mediates augmented neutrophil/endothelial adhesion. **Proc. Natl Acad. Sci. USA,** v. 81(7), p. 2191–93, 1984.

IZIDORO, L. F. M.; RIBEIRO, M. C.; SOUZA, G. R. L.; SANT'ANA, C. D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, A. I.; GOULART, L. R.; BELEBONI, R. O.; NOMIZIO, A.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, p. 7034-43, 2006.

JANCARIK, J.; KIM, S. H. Sparse-matrix sampling—a screening method for crystallization of proteins, **J. Appl. Crystallogr.** v. 24, p. 409–411, 1991.

JIANG, Y.; LI, Y.; LEE, W.; XU, X.; ZHANG, Y.; ZHAO, R.; ZHANG, Y.; WANG, W. Venom gland transcriptomes of two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) and evolution of toxin genes. **BMC Genomics**, v.12:1, 2011.

JUAREZ, P.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake venomics: characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. **Proteomics,** v. 4(2), p. 327-38, 2004.

JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L. M.; FARSKY, S. H.; OLIVEIRA, M. L.; HO, P. L. Molecular cloning and expression of a functional snake venom endothelium factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* Pit Viper. **J. Biol. Chem.,** v. 276, p. 39836-39842, 2001.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L. A survey of gene expresion and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene,** v. 299, p. 279-291, 2002.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; CHING, A. T.; CARVALHO, E.; FARIA, F.; NISHIYAMA, M.Y. JR.; HO, P. L.; DINIZ, M. R.; *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: implications for snake toxin repertoire evolution. **Genetics,** v. 173(2), p. 877-89, 2006.

KAISER, I. I.; GUTIÉRREZ, J. M.; PLUMMER, D.; AIRD, S. D.; ODELL, G. V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys.,** v. 278(2), p. 319–325, 1990.

KANG, T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M. T.; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R. K.; SINGH, T. P.; MANJUNATHA KINI, R. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS J.** 2011 [Epub ahead of print].

KASAMA, T.; STRIETER, R. M.; STANDIFORD, T. J.; BURDICK, M. D.; KUNKEL, S. L. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. **J. Exp. Med.**, v. 178(1), p. 63-72, 1993.

KASHIMA, S.; SOARES, A. M.; ROBERTO, P. G.; PEREIRA, J. O.; ASTOLFI-FILHO, S.; CINTRA, A. O.; FONTES, M. R.; GIGLIO, J. R.; FRANCA, S. C. cDNA sequence and molecular modeling of a nerve growth factor from *Bothrops jararacussu* venomous gland. **Biochimie,** v. 84(7), p. 675-80, 2002.

KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; SOARES, A. M.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; GIULIATI, S.; FARIA, M. JR.; XAVIER, M. A.; FONTES, M. R.; GIGLIO, J. R.; FRANCA, S. C.; Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I--gene expression profile of highly expressed phospholipases A_2. **Biochimie,** v. 86(3), p. 211-9, 2004.

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

KHASELEV, N.; MURPHY, R. C. Susceptibility of plasmenyl glycerophospho ethanolamine lipids containing arachidonate to oxidative degradation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26(3-4), p. 275-84, 1999.

KINI, R. M. Venom phospholipase A_2 enzymes, Structure, Function and Mechanisms. Wiley, New York, 1997.

KINI, R. M; EVANS, H. J. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. **Int. J. Pept. Protein Res.**, v. 34(4), p. 277-86, 1989.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. The role of enzymatic activity in inhibition of the extrinsic tenase complex by phospholipase A2 isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. **Toxicon,** v. 33, n. 12, p. 1585-90, 1995.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. Effects of phospholipase A_2 enzymes on platelet aggregation. In: Kini RM; editor. Venom phospholipase A_2 enzymes: structure; function and mechanism. England: John Wiley and Sons Ltd.; p. 369-387. 1997.

KOUYOUMDJIAN, J. A.; HARRIS, J. B.; JOHNSON, M. A. Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. **Toxicon**, v. 24, p. 575–83, 1986.

KULKEAW, K.; CHAICUMPA, W.; SAKOLVAREE, Y.; TONGTAWE, P.; TAPCHAISRI, P. Proteome and immunome of the venom of the Thai cobra, *Naja kaouthia.* **Toxicon.** v. 49, n. 7, p. 1026-41, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature,** v. 227(5259), p. 680-685, 1970.

LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A_2. **Trends Pharmacol. Sci.,** v. 20, p. 162-70, 1999.

LANDUCCI, E. C.; CASTRO, R. C.; PEREIRA, M. F.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A_2 homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 343, n. 2-3, p. 257-263, 1998.

LANDUCCI, E. C.; TOYAMA, M.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, O.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Effect of crotapotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A2. **Toxicon,** v. 38, p. 199-208, 2000.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. Procheck – a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Crystallogr.** v. 26, p. 283–291., 1993.

LI, S.; WANG, J.; ZHANG, X.; REN, Y.; WANG, N.; ZHAO, K.; CHEN, X.; ZHAO, C.; LI, X.; SHAO, J.; YIN, J.; WEST, M. B.; XU, N.; LIU, S. Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja* atra and *Agkistrodon halys.* **Biochem. J.,** v. 384(Pt 1), p.119-27, 2004.

LIZANO, S.; LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Cloning and cDNA sequence analysis of Lys(49) and Asp(49) basic phospholipase A(2) myotoxin isoforms from *Bothrops asper*. Int. J. Biochem. Cell. Biol., v. 33(2), p. 127-32, 2001.

LLORET, S.; MORENO, J. J. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A_2 purified from porcine pancreas and snake venoms. **Toxicon**, v. 31(8), p. 949-56, 1993.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; FURTADO, M. F.; OTERO, R.; ROSSO, J. P.; VARGAS, O.; CARMONA, E.; ROVIRA, M. E. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**, v. 28(10), p. 1137-46, 1990.

LOMONTE, B.; TARKAWESHI, A.; HANSON, L. A. Host response to *Bothorps asper* snake venom. Analysis of oedema formation, inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. **Inflammation,** v. 17, p. 93–105. 1993.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDEROÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A_2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, p. 885–901, 2003a.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; MORENO, E. Synthetic peptides derived from the C-terminal region of Lys49 phospholipase A_2 homologues from viperidae snake venoms: biomimetic activities and potential applications. **Curr. Pharm. Des.** v. 16(28), p. 3224-30, 2010.

LU, Q. M.; JIN, Y.; WEI, J. F.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L. Biochemical and biological properties of *Trimeresurus jerdonii* venom and characterization of a platelet aggregation-inhibiting acidic phospholipase A_2. J. Nat. Toxins, v. 11(1), p. 25-33, 2002.

MAGRO, A. J.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A_2: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 311(3), p. 713-20, 2003.

MAGRO, A. J.; MURAKAMI, M. T.; MARCUSSI, S.; SOARES, A. M.; ARNI, R. K.; FONTES, M. R. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A_2 in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 323(1), p. 24-31, 2004

MAGRO, A. J.; TAKEDA, A. A.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Structure of BthA-I complexed with p-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activity. **Acta Crystallogr.,** v. 61(Pt 12), p. 1670-72, 2005.

MAITY, G.; MANDAL, S.; CHATTERJEE, A.; BHATTACHARYYA, D. Purification and characterization of a low molecular weight multifunctional cytotoxic phospholipase A_2 from *Russell*'s viper venom. **J. Chromatogr.**, v. 845(2), p. 232-43, 2007.

MALONEY, C. G.; KUTCHERA, W. A.; ALBERTINE, K. H.; MCINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A. Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. **J. Immunol.**, v. 160(3), p. 1402-10, 1998.

MANCUSO, L. C.; CORREA, M. M.; VIEIRA, C. A.; CUNHA, O. A. B.; LACHAT, J.-J.; SELISTRE DE ARAÚJO, H. S.; OWNBY, C. L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon**, v.33(5), p.615-26, 1995.

MARCHI-SALVADOR, D. P.; CORRÊA, L. C.; MAGRO, A. J.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A_2 formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Proteins**, v. 72(3), p. 883-91, 2008.

MARCHI-SALVADOR, D. P.; FERNANDES, C. A.; SILVEIRA, L. B.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Crystal structure of a phospholipase A(2) homolog complexed with p-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1794(11), p. 1583-90, 2009.

MARCINKIEWICZ, C.; WEINREB, P. H.; CALVETE, J. J.; KISIEL, D. G.; MOUSA, S. A.; TUSZYNSKI, G. P.; LOBB, R. R. Obtustatin: a potent selective inhibitor of α1β1 integrin in vitro and angiogenesis in vivo. **Cancer. Res.,** v. 63, p. 2020–23, 2003.

MATHESIUS, U.; KEIJZERS, G.; NATERA, S. H.; WEINMAN, J. J.; DJORDJEVIC, M. A.; ROLFE, B. G. Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. **Proteomics,** v. 1(11), p. 1424-40, 2001.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta,** v. 1477(1-2), p. 146-56, 2000.

MEBS D. Toxicity in animals. Trends in evolution? **Toxicon**, v. 39(1), p. 87-96, 2001.

MÉNEZ, A. Perspectives in Molecular Toxinology, Wiley, Chichester, 2002.

MINISTÉRIO da SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 6ed.; pp.320; 2005.

MODESTO, J. C. A.; SPENCER, P. J.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R. C.; OLIVA, M. L.; DA SILVA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; GUARNIERI, M. C. BE-I-PLA$_2$, a novel acidic phospholipase A$_2$ from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I2 release by endothelial cells. **Biochem. Pharmacol**. v. 72(3), p. 377-84, 2006.

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

MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; SOARES, A. M.; ZAMUNÉR, S. R.; PURGATTO, E.; TEIXEIRA, C. F. P. Secretory phospholipases A$_2$ isolated from *Bothrops asper* and from *Crotalus durissus terrificus* snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E2 and D2 and expression of cyclooxygenases. **Toxicon,** v. 52(3), p. 428-39 2008.

MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; AMARAL, R. B.; ZAMUNÉR, S. R.; TEIXEIRA, C. F. Effects of *Bothrops asper* snake venom on the expression of cyclooxygenases and production of prostaglandins by peritoneal leukocytes *in vivo*, and by isolated neutrophils and macrophages in vitro. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 80(2-3), p. 107-14, 2009.

MORENO, J. J.; FERRER, X.; ORTEGA, E.; CARGANICO, G. PLA2-induced oedema in rat skin and histamine release in rat mast cells. Evidence for involvement of lysophospholipids in the mechanism of action. **Agents Actions.,** v. 36, n. 3-4, p. 258-263, 1992.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; THEAKSTON, R. D.; CRAMPTON, J. M. Evolution of disintegrin cysteine-rich and mammalian matrix-degrading metalloproteinases: gene duplication and divergence of a common ancestor rather than convergent evolution. **J. Mol. Evol.,** v. 43, p. 263–69, 1996.

MURAKAMI, M.; TADA, K.; SHIMBARA, S.; KAMBE, T.; SAWADA, H.; KUDO, I. Detection of secretory phospholipase A$_2$s related but not identical to type IIA isozyme in cultured mast cells. **FEBS Lett.,** v. 413, p. 249-254, 1997.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Secretory phospholipase A_2. **Biol. Pharm. Bull**, v. 27(8), p. 1158-64, 2004.

NAWARAK, J.; SINCHAIKUL, S.; WU, C. Y.; LIAU, M. Y.;PHUTRAKUL, S.; CHEN, S. T. Proteomics of snake venoms from Elapidae and Viperidae families by multidimensional chromatographic methods. **Electrophoresis,** v. 24, p. 2838-2854, 2003.

NEIVA, M.; ARRAES, F. B.; DE SOUZA, J. V.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; PRIETO DA SILVA, A. R.; WALTER, M. E.; BRIGIDO, M DE M.; YAMANE, T.; LÓPEZ-LOZANO, J. L.; ASTOLFI-FILHO, S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon,** v. 53(4), p. 427-36, 2009.

NIIRO, H.; OTSUKA, T.; IZUHARA, K.; YAMAOKA, K.; OHSHIMA, K.; TANABE, T.; HARA, S.; NEMOTO, Y.; TANAKA, Y.; NAKASHIMA, H.; NIHO, Y. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. **Blood**, v. 89(5), p. 1621-8, 1997.

NISENBOM, H. E.; PERAZZO, J. C.; MONSERRAT, A. J.; VIDAL, J. C. Contribution of phospholipase A_2 to the lethal potency of *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. **Toxicon**, v. 24(8), p. 807-17, 1986.

NISENBOM, H. E.; PERAZZO, J. C.; MONSERRAT, A. J.; VIDAL, J. C. Effect of chemical modification with p-bromophenacyl bromide on the enzymatic and lethal properties of phospholipase A_2 from *Bothrops alternatus* (Víbora de la Cruz) venom. **Toxicon,** v. 26(12), p. 1137-44, 1988.

OGAWA, T.; NAKASHIMA, K.; NOBUHISA, I.; DESHIMARU, M.;SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; SAKAKI, Y.; HATTORI, S.; OHNO, M. Accelerated evolution of snake venom phospholipase A_2 isozymes for acquisition of diverse physiological functions. **Toxicon,** v.34, p.1229-1236, 1996.

OGAWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; OHNO, M. Evidence for functional involvement of asparagine 67 in substrate recognition by snake venom phospholipases A_2, **J. Biochem.**, v. 122, p. 955–960, 1997.

OHNO, M.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; HATTORI, S. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A_2 from snake venom. **Toxicon,** v. 42(8), p. 841-54, 2003.

OLIVO, R. A.; TEIXEIRA, C. F.; WALLACE, J. L.; GUTIÉRREZ, J. M.; ZAMUNER, S. R. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon**, v. 49(5), p. 670-7, 2007.

OWNBY, C.L.; SELISTRE DE ARAÚJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine49 phospholipase A_2 proteins. **Toxicon,** v. 37(3), p. 411-445, 1999.

PACE-ASCIAK, C. R.; REYNAUD, D.; DEMIN, P.; NIGAM, S. The hepoxilins. A review. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 447, p. 123-32, 1999.

PAHARI, S.; MACKESSY, S. P.; LINI, M. R. The venom gland transcriptome of Desert Massasauga rattlesnake (*Sistrurus caternatus edwardsii)* towards an understanding of venom composition among advanced snakes (superfamily *Coluboidea).* **BMC Mol. Biol.** v. 8, n.1. 2007.

PALMBLAD, J.; LINDSTROM, P.; LERNER, R. Leukotriene B4 induced hyperadhesiveness of endothelial cells for neutrophils. Biochem. Biophys. **Res. Commun.,** v. 166 (2), p. 848–851, 1990.

PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOECHEA, J. A.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A_2 from *Bothrops asper* snake venom--synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. **Eur. J. Biochem.,** v. 253, p. 452-61, 1998.

PENG J.; GYGI, S. P. Proteomics: the move to mixtures. **J. Mass Spectrom.,** v. 36(10), p. 1083-91, 2001.

PERCHUC, A. M.; MENIN, L.; FAVREAU, P.; BÜHLER, B.; BULET, P.; SCHÖNI, R.; WILMER, M.; ERNST, B.; STÖCKLIN, R. Isolation and characterization of two new Lys49 PLA_2s with heparin neutralizing properties from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 55(6), p. 1080-92, 2010.

PIMENTA, A. M.; STOCKLIN, R.; FAVREAU, P.; BOUGIS, P. E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). **Rapid Commun. Mass Spectrom.,** v. 15, 1562–72, 2001.

PONCE-SOTO LA, TOYAMA MH, HYSLOP S, NOVELLO JC, MARANGONI S. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA_2 from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **J. Protein Chem.**, v. 21(3), p. 131-6, 2002.

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 PLA_2 D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using *in vitro* neuromuscular preparation. **Protein J.,** v. 25(2), p. 47-55, 2006.

PONCE-SOTO, L. A.; BALDASSO, P. A.; ROMERO-VARGAS, F. F.; WINCK, F. V.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. Biochemical, pharmacological and structural characterization of two PLA_2 isoforms Cdr-12 and Cdr-13 from *Crotalus durissus ruruima* snake venom. **Protein J.,** v. 26(1), p.39-49, 2007a.

PRADELLES, P.; GRASSI, J.; MAC LOUF, J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. **Analyt. Chem.,** v. 57, p. 1170-1173, 1985.

PRUZANSKI, W.; VADAS, P. Phospholipase A_2 - a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. **Immunol. Today,** v. 12(5), p. 143-46, 1991.

RENETSEDER, R.; DIJKSTRA, B. W.; HUIZINGA, K.; KALK, K. H.; DRENTH, J. Crystal-structure of bovine pancreatic phospholipase-A_2 covalently inhibited by para-bromo-phenacylbromide. **J. Mol. Biol.** v. 200, p. 181–188, 1988.

RIOUX, V.; GERBOD, M. C.; BOUET, F.; MENEZ, A.; GALAT, A. Divergent and common groups of proteins in glands of venomous snakes. **Electrophoresis,** v. 19, p. 788–96,1998.

RIZZO, M. T.; NGUYEN, E.; ALDO-BENSON, M.; LAMBEAU, G. Secreted phospholipase A_2 induces vascular endothelial cell migration. **Blood,** v. 96, p. 3809-3815, 2000.

ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, J. O.; ASTOLFI-FILHO, S.; NOMIZO, A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R.; SOARES, A. M.; FRANÇA, S. C. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A_2 from *Bothrops jararacussu* venom. **Protein J.**, v. 23(4), p. 273-85, 2004a.

ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; SOARES, A. M.; CHIOATO, L.; FAÇA, V. M.; FULY, A. L.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; FRANÇA, S. C. Cloning and expression of an acidic platelet aggregation inhibitor phospholipase A_2 cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland. **Protein Expr. Purif.**, 37(1), p. 102-8, 2004b.

RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R. S.; ARAÚJO, A. L.; MALTA-NETO, N. R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI- BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipase A_2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon,** v. 44, p. 305-314, 2004.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F.; 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. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A_2 from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50(1), p. 153-65, 2007.

ROSENBERG, P.; CONDREA, E.; RAPUANO, B.E.; SOONS, K.R.; YANG, C.C. Dissociation of pharmacological and enzymatic activities of snake venom phospholipases A_2 by modification of carboxylate groups**. Biochem. Pharmacol.,** v. 32(23), p. 3525-30, 1983.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake in South America. In: BÜCHERT, W.; BUCKLEY, E. (Ed.). **Venomous Animals and Their Venoms,** New York: Academic Press, 1971. p. 345-384.

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; TEIXEIRA, C. F.; FERNÁNDES, C. M.; DIAZ, C.; GUTIÉRREZ, 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.**, v. 11(2), p. 121-8, 2002.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation. A review. **Am. J. Pathol.** v. 86(1), p. 183-276, 1977.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. In: Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Habour Laboratory Press, New York, 1989.

SAMPAIO, S. C.; RANGEL-SANTOS, A. C.; PERES, C. M.; CURI, R.; CURY, Y.; Inhibitory effect of phospholipase A(2) isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. **Toxicon**, v.45, p. 671–676, 2005.

SAMPAIO, S. C.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; BRIGATTE, P.; LANDGRAF, R. G.; DOS SANTOS, E. C.; CURI, R.; CURY, Y. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage pahgocytosis. **Toxicon,** v. 47, p. 313–321, 2006

SAMPAIO, S. C.; HYSLOP, S.; FONTES, M. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; ZAMBELLI, V. O.; MAGRO, A. J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V. P.; CURY, Y. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon,** v. 55(6), p. 1045-60 2010.

SANT'ANA, C. D.; TICLI, F. K.; OLIVEIRA, L. L.; GIGLIO, J. R.; RECHIA, C. G.; FULY, A. L.; SELISTRE DE ARAÚJO, H. S.; FRANCO, J. J.; STABELI, R. G.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. BjussuSP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 151(3), p. 443-54, 2008.

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 A_2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52(8), p. 908-17, 2008.

SARAU, H. M.; FOLEY, J. J.; SCHMIDT, D. B.; MARTIN, L. D.; WEBB, E..F.; TZIMAS, M. N.; BRETON, J. J.; CHABOT-FLETCHER, M.; UNDERWOOD, D. C.; HAY, D. W.; KINGSBURY, W.D.; CHAMBERS, P. A.; PENDRAK, I.; JAKAS, D. R.; SATHE, G. M.; VAN HORN, S.; DAINES, R. A.; GRISWOLD, D. E. *In vitro* and *in vivo* pharmacological characterization of SB 201993, an eicosanoid-like LTB4 receptor antagonist with anti-inflammatory activity. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids,** v. 61(1), p. 55-64, 1999.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A_2 superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1761(11), p. 1246-59, 2006.

SCHMEDTJE JR., J. F.; JI, Y. S.; LIU, W. L.; DUBOIS, R. N.; RUNGE, M. S. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappa B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. **J. Biol. Chem.,** v. 272, p. 601-8, 1997.

SELISTRE DE ARAÚJO, H. S.; QUEIROZ, L. S.; CUNHA, O. A. B.; DE SOUZA, G. E. P.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of hemorragic, myonecrotic and edema inducing toxins from *Bothrops insularis* (Jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v. 28(3), p. 261-273, 1990.

SERHAN, C. N.; TAKANO, T.; MADDOX, J. F. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and stable analogs on lipoxin A4 are potent inhibitors of acute inflammation. **Adv. Exp. Med. Biol.,** v. 447, p. 133-49. 1999.

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 A_2, BJ-PLA$_2$, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. **Arch. Biochem. Biophys.,** v. 367(1), p. 26-32, 1999.

SERRANO, S. M.; SHANNON, J. D.; WANG, D.; CAMARGO, A. C.; FOX, J. W. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, p. 501-510, 2005.

SETO, M.; OGAWA, T.; KODAMA, K.; MURAMOTO, K.; KANAYAMA, Y.; SAKAI, Y.; CHIJIWA, T.; OHNO, M.; A novel recombinant system for functional expression of myonecrotic snake phospholipase A_2 in *Escherichia coli* using a new fusion affinity tag. **Protein Expr. Purif**. v. 58(2), p. 194-202, 2008.

SHIRAI, R.; TORIBA, M.; HAYASHI, K.; IKEDA, K.; INOUE, S. Identification and characterization of phospholipase A_2 inhibitors from the serum of the Japanese rat snake, *Elaphe climacophora*. **Toxicon,** v. 53(6), p. 685-92, 2009.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A_2 enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta,** v. 1488(1-2), p. 1-19, 2000.

SMITH, C. W., MARLIN, S. D., ROTHLEIN, R., TOMAN, C. AND ANDERSON, D. C. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. **J. Clin. Invest**., v. 83, p. 2008-2017, 1989

SOARES, A. M.; ANZALONI-PEDROSA, L. H.; FONTES, M. R. M.; DA SILVA, R. J.; GIGLIO, J. R. Polyacrylamide gel electrophoresis as a tool for the taxonomic identification of snakes from the Elapidae and Viperidae families. **J. Venom. Anim. Toxins**, 4, p. 137-42, 1998b

SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A_2 homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.,** v. 373(1), p. 7-15, 2000a.

SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; BORTOLETO, R. K.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; ARNI, R. K.; WARD, R. J.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A_2 from *Bothrops pirajai* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 387(2), p. 188–96, 2001

SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R. Phospholipases A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Curr. Org. Chem.,** v.8; p.1677-1690; 2004a.

SOARES, A.M.; SESTITO, W.P.; MARCUSSI, S.; STÁBLEI, R.G.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; CUNHA, O.A.B.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R. Alkylation of myotoxic phospholipases A_2 in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.,** v.36; p.258–270, 2004b.

STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R.; SOARES, A. M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A_2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins**. Comp. Biochem. Physiol.,** v. 142(3-4), p. 371-81, 2006.

SUN, M.Z.; LIU, S.; YANG, F.; GREENAWAY, F.T.; XU, Y. A novel phospholipase A_2 from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* venom: purification, proteomic, functional and structural characterizations. **Biochimie**, v. 91(4), p. 558-67, 2009.

SUZUKI, N.; ISHIZAKI, J.; YOKOTA, Y.; HIGASHINO, K.; ONO, T.; IKEDA, M.; FUJII, N.; KAWAMOTO, K.; HANASAKI, K. Structures, enzymatic properties, and expression of novel human and mouse secretory phospholipase A_2s. **J. Biol. Chem.**, v. 275(8), p. 5785-93, 2000.

SYRBU, S. I.; WATERMAN, W. H.; MOLSKI, T. F.; NAGARKATTI, D.; HAJJAR, J. J.; SHA'AFI, R. I. Phosphorylation of cytosolic phospholipase A_2 and the release of arachidonic acid in human neutrophils. **J. Immunol.** v. 162(4), p. 2334-40, 1999.

TADA, K.; MURAKAMI, M.; KAMBE, T.; KUDO, I. Induction of cyclooxygenase-2 by secretory phospholipases A2 in nerve growth factor-stimulated rat serosal mast cells is facilitated by interaction with fibroblasts and mediated by a mechanism independent of their enzymatic functions. **J. Immunol.,** v. 161(9), p. 5008-5015, 1998.

TANI, A.; OGAWA, T.; NOSE, T.; NIKANDROV, N. N.; DESHIMARU, M.; CHIJIWA, T.; CHANG, C. C.; FUKUMAKI, Y.; OHNO, M. Characterization, primary structure and molecular evolution of anticoagulant protein from *Agkistrodon actus* venom. **Toxicon,** v. 40, p. 803–13, 2002.

TEIXEIRA, C. F.; CURY, Y.; OGA, S.; JANCAR, S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). **Toxicon**, v. 32(4), p. 419-26, 1994.

TEIXEIRA, C. F.; ZAMUNÉR, S. R.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; CRUZ-HOFLING, M. A.; FERNANDES, I.; CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J. M. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. **Muscle Nerve**, v. 28(4), p. 449-59, 2003a.

TEIXEIRA, C. F.; LANDUCCI, E. C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A_2. **Toxicon**, v. 42(8), p. 947-62, 2003b.

TEIXEIRA, C. F.; CHAVES, F.; ZAMUNÉR, S. R.; FERNANDES, C. M.; ZULIANI, J. P.; CRUZ-HOFLING, M. A.; FERNANDES, I.; GUTIÉRREZ, J. M. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 86(2), p. 107-15, 2005.

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

TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; DA SILVA, F. M.; MARCHI-SALVADOR. D. P.; SILVA JR, F. P.; 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 A(2) from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. **Arch. Toxicol.**, v. 85(10), p. 1219-33, 2011.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **J. Clin. Invest.,** v. 108(1), p. 15-23, 2001.

TREBIEN, H. A.; CALIXTO, J. B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Actions,** v. 26, p. 292-300, 1989.

TSAI, I. H.; TSAI, H. Y.; WANG, Y. M.; TUN-PE; WARRELL, D. A. Venom phospholipases of *Russell*'s vipers from Myanmar and eastern India-cloning, characterization and phylogeographic analysis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1774(8), p. 1020-8, 2007.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A_2 tell us about functional diversity of mammalian secreted phospholipases A_2? **Biochimie,** v. 82(9-10), p. 815-831, 2000.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. Bioquímica de venenos de serpentes. In: **Venenos. Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos.** p.205-223; 1999.

VERHEIJ, H. M.; VOLWERK, J. J.; JANSEN, E. H.; PUYK, W. C.; DIJKSTRA, B. W.; DRENTH, J.; DE HAAS, G. H. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A_2. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry,** v. 19, p. 743-750, 1980.

VESTERBERG, O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. **Biochim. Biophys. Acta,** v. 257; p. 11-9, 1972.

WAKELIN, M. W.; SANZ, M. J.; DEWAR, A.; ALBELDA, S. M.; LARKIN, S. W.; BOUGHTON-SMITH, N.; WILLIAMS, T. J.; NOURSHARGH, S. An anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane.. **J. Exp. Med.** v. 184(1), p. 229–39, 1996.

WARD, R. J.; DE OLIVEIRA, A. H.; BORTOLETO, R. K.; ROSA, J. C.; FAÇA, V. M.; GREENE, L. J. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys49-phospholipase A_2 homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.**, v. 21(1), p. 134-40, 2001.

WATANABE, L.; SOARES, A. M.; WARD, R. J.; FONTES, M. R.; ARNI, R. K. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A_2: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid. **Biochimie**, v. 87(2), p. 161-97, 2005.

WAGSTAFF, S. C.; HARRISON, R. A. Venom gland EST analysis of the saw- scaled viper, *Echis ocelatus,* reveals novel "9!1 integrin-binding motifs in venom metaloproteases and a new group of putative toxins, rennin-like aspartic proteases. **Gene.** v. 377, p. 21-32, 2006.

WEI, J. F.; WEI, X. L.; MO, Y. Z.; HE, S. H. Induction of mast cell accumulation, histamine release and skin edema by N49 phospholipase A_2. **BMC Immunol.** v. 10, p. 21, 2009.

WISNER, A.; LEDUC, M.; BON, C. C-type lectins from snake venoms: new tools for research in thrombosis and haemostasis. In: **Perspectives In Molecular Toxinology,** Ménez, A. (ed.) Wiley, Chichester , UK; p.357-375; 2002.

WU, D.; MARKO, M.; CLAYCOMBE, K.; PAULSON, K. E.; MEYDANI, S. N. Ceramideinduced and age-associated increase in macrophage COX-2 expression is mediated through up-regulation of NF-kappa B activity. **J. Biol. Chem.,** v. 278, p. 10983-92, 2003.

WU, K. K. Control of cyclooxygenase-2 transcriptional activation by pro-inflammatory mediators. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids,** v. 72(2), p. 89-93, 2005.

XIN, Y.; CHOO, Y. M.; HU, Z.; LEE, K. S.; YOON, H. J.; CUI, Z.; SOHN, H. D.; JIN, B. R. Molecular cloning and characterization of a venom phospholipase A_2 from the bumblebee *Bombus ignitus*. **Comp. Biochem. Physiol.,** v. 154(2), p. 195-202, 2009.

YAMAMOTO, K.; ARAKAWA, T.; UEDA, N.; YAMAMOTO, S. Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alphadependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. **J. Biol. Chem.,** v. 270(52), p. 31315-20, 1995.

YANES, O.; AVILES, F. X.; WENZEL, R.; NAZABAL, A.; ZENOBI, R.; CALVETE, J. J. Proteomic Profiling of a Snake Venom Using High Mass Detection MALDI-TOF Mass Spectrometry. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.,** v. 18(4), p. 600-6 2007.

YANG, W. L.; PENG, L. S.; ZHONG, X. F.; WEI, J. W.; JIANG, X. Y.; YE, L. T.; ZOU, L.; TU, H. B.; WU, W. Y.; XU, A. L. Functional expression and characterization of a recombinant phospholipase A_2 from sea snake *Lapemis hardwickii* as a soluble protein in *E. coli*. **Toxicon**, v. 41(6), p. 713-21, 2003.

YOKOMIZO, T.; OGAWA, Y.; UOZUMI, N.; KUME, K.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. cDNA cloning and mutagenesis study of leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 407, p. 151-6, 1997.

ZAMUNER, S. R.; TEIXEIRA, C. F. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. **Mediators Inflamm.**, v. 11(6), p. 351-7, 2002.

ZHANG, B.; LIU, Q.; YIN, W.; ZHANG, X.; HUANG, Y.; LUO, Y.; QIU, P.; SU, X.; YU, J.; HU, S.; YAN, G. Transcriptome analysis of *Deinagkistrodon acutus* venomous gland focusing on cellular structure and functional aspects using expressed sequence tags. **BMC Genomics.,** v. 7, p. 152, 2006.

ZHAO, X.; YEH, J. Z.; NARAHASHI, T. Post-stroke dementia: nootropic drug modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **Ann. N.Y. Acad. Sci.,** v. 939, p. 179–86, 2001.

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 A_2 from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration. **Toxicon,** v. 53(4), p. 444-53, 2009.

ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; ZAMUNER, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A_2 isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45(3), p. 335-46, 2005a.

ZULIANI, J. P.; GUTIÉRREZ, J. M.; SILVA, L. L. C.; SAMPAIO, S. C.; LOMONTE, B.; TEIXEIRA, C. F. P. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A_2. **Toxicon**, v. 46, p. 523–32, 2005b.

ZYCHAR, B. C.; DALE, C. S.; DEMARCHI, D. S.; GONÇALVES, L. R. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A_2 to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon**, v. 55(2-3), p. 227-34, 2010

Anexos

ANEXO

Anexo I

Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE ÉTICA
CEUA
NO USO DE ANIMAIS
Campus de Ribeirão Preto

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 07.1.515.53.0), intitulado: "Efeito de Fosfolipases A2 nativa e recombinante de Bothrops moojeni sobre a inflamação", de autoria de **Lucas Blundi Silveira** e de **Andreimar Martins Soares,** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 14.09.07

Ribeirão Preto, 23 de novembro de 2007

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 4469 – Fax: (16) 3633 7964