

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Rafhaella Carolina Cedro Araújo

Ribeirão Preto

2014

Resumo

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

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

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

Abstract

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

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

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

INTRODUÇÃO

1- Introdução

1.1 - Acidentes Ofídicos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 - Gênero *Bothrops*

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

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

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

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

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

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

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

1.3 - *Bothrops jararaca*

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4 - Fosfolipases

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

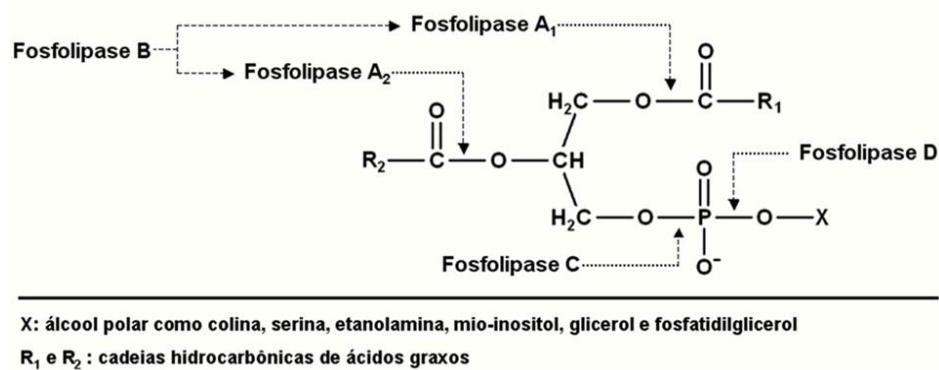


Figura 2. Sítio de ação das fosfolipases. Adaptado de KINI, 1997. (Fonte: OLIVEIRA, 2006).

As fosfolipases A₁ (PLA₁) clivam a cadeia fosfolipídica na posição *sn*-1 e são encontradas nos mais diversos tecidos e organismos (AOKI et al., 2002). Nas indústrias farmacêuticas são utilizadas como insumo, devido à ação emulsificante que possuem (SONG: RHEE, 2001).

As fosfolipases A₂ catalisam a hidrólise de ácidos graxos na posição *sn*-2 das membranas fosfolipídicas e liberam, como subprodutos, ácidos graxos livres. Os principais ácidos graxos liberados são os poli-insaturados, dentre eles o ácido araquidônico e os lisofosfolípídeos. O ácido araquidônico é um precursor de eicosanoides (presentes na inflamação) e de lisofosfolípídios como o ácido lisofosfatídico e lisofosfatidilcolina. Os lisofosfolípídios são precursores de mediadores bioativos como o fator de ativação plaquetária (PAF) (KUDO, 2004).

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

As fosfolipases C (PLC) são fosfodiesterases que possuem vários domínios, capazes de produzir inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3, mensageiro mobilizador de cálcio) e diacilglicerol (DAG) ativador da quinase C, sendo de suma importância no metabolismo de fosfolípídios inositólicos (REBECCHI; PENTYALA, 2000). Também possuem ação importante na sinalização celular em mamíferos, agindo em hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento e outros estímulos extracelulares (HARDEN; SONDEK, 2006).

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

As fosfolipases A_2 ainda foram divididas em 6 grandes grupos, PLA_{2s} secretadas (sPLA₂), PLA_{2s} citosólicas (cPLA₂), PLA_{2s} Ca²⁺-independentes (iPLA₂), PLA_{2s} fator de plaquetas ativador de acetilhidrolases (PAF-AH), PLA_{2s} lisossomais (LyPLA₂) e PLA_{2s} de adipócitos específicos (AdPLA₂) (QUACH et al., 2014).

Six e Dennis (2000), baseando-se em critérios bioquímicos e estruturais, como a massa molecular relativa (Mr), padrão de pontes dissulfeto, substrato fosfolipídico, sequência de aminoácidos, dependência de íon Ca²⁺, estrutura gênica e atividade catalítica, dividiu os 6 grupos formando 15 subfamílias, como mostra a Tabela 2 (SIX e DENNIS, 2000).

A denominação de PLA_{2s} secretadas foi dada devido a grande quantidade de PLA_{2s} do grupo II encontradas em fluidos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide e se estendeu para as outras. As sPLA_{2s} compreendem os grupos I, II, III, V, IX, X, XI e XII (SIX e DENNIS, 2000). Aquelas presentes no grupo I são encontradas no suco pancreático de mamíferos e na peçonha das serpentes das famílias Elapidae e Hydrophidae. Já as do grupo II são encontradas na peçonha das serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae, na peçonha da serpente Gaboon (grupo IIB), no testículo de camundongos (IIC), no baço e pâncreas de camundongos e humanos (grupo IID), no útero, cérebro e coração de camundongos e humanos (IIE) e no embrião e testículos de camundongos (grupo IIF) (SIX e DENNIS, 2000). No grupo III, estão representadas as sPLA_{2s} de veneno de abelha, lagartos, exsudatos inflamatórios e grânulos de plaquetas e mastócitos. No grupo V encontram-se as PLA_{2s} de macrófagos, coração e pulmão de mamíferos. O grupo X é composto pelas PLA_{2s} isoladas do timo, baço e leucócitos de humanos. E, as sPLA_{2s} dos grupos XI e XII foram isoladas de plantas e células T-helper, respectivamente (DENNIS, 1994; HO et al., 2001).

Tabela 2. Classificação das fosfolipases*

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

*De acordo com Schaloske e Dennis (2006).

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

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

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

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

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

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

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

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

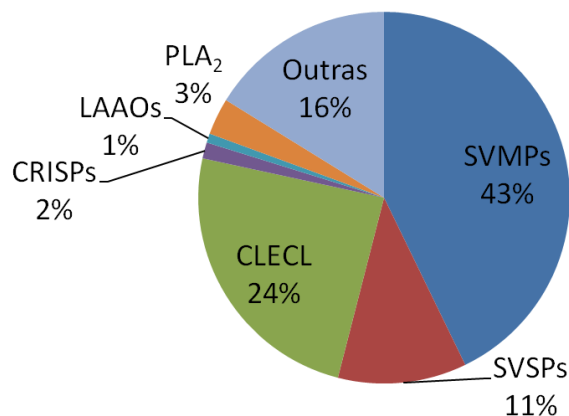


Figura 3. Distribuição das proteínas em porcentagem (%) encontradas na peçonha da serpente *Bothrops jararaca* obtida a partir da técnica proteômica. SVMPs (metaloproteases); SVSPs (serinoproteases); CLECL (lectinas like tipo-C); PLA₂ (fosfolipase A₂); CRISPs (proteínas secretoras ricas em resíduos de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

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

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

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

1.5 - svPLA₂s e o Processo Inflamatório

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.6 - Potencial antitumoral das svPLA₂s

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSÕES

6 - Conclusões

Com base nos resultados conclui-se que:

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

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

7- Referências

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

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

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

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

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

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

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

- BORN, G.V.R.; CROSS, M.J. The aggregation of blood platelets. **J Physiol**, (168) 178-195, 1962.
- BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). **Journal of Thermal Biology**, 31(1–2): 208-219, 2006.
- BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **J Lipid Res**, 50 Suppl: S237-242, 2009.
- CALDERON, L. A.; SOBRINHO, J. C.; ZAQUEO, K. D.; DE MOURA, A. A.; GRABNER, A. N.; MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; NOMIZO, A.; FERNANDES, C. F.; ZULIANI, J. P.; CARVALHO, B. M.; DA SILVA, S. L.; STABELI, R. G.; SOARES, A. M. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. **Biomed Res Int**, 2014: 203639, 2014.
- CALVETE, J. J.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, 42(11): 1405-1414, 2007.
- CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; VORRARO, F.; DE FRANCO, M.; IBANEZ, O. M.; STAROBINAS, N. Bothrops jararaca venom (BjV) induces differential leukocyte accumulation in mice genetically selected for acute inflammatory reaction: the role of host genetic background on expression of adhesion molecules and release of endogenous mediators. **Toxicon**, 52(5): 619-627, 2008.
- CARRASCO, P. A.; MATTONI, C. I.; LEYNAUD, G. C.; SCROCCHI, G. J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, 41(2): 109-124, 2012.
- CHAIM-MATYAS, A.; OVADIA, M. Cytotoxic activity of various snake venoms on melanoma, B16F10 and chondrosarcoma. **Life sciences**, 40(16): 1601-1607, 1987.

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

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

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

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

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

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

DE CARVALHO, D. D.; SCHMITMEIER, S.; NOVELLO, J. C.; MARKLAND, F. S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon**, 39(10): 1471-1476, 2001.

DE CASTRO, R. C.; LANDUCCI, E. C.; TOYAMA, M. H.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A₂ into the rat pleural cavity. **Toxicon**, 38(12): 1773-1785, 2000.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J Biol Chem**, 269(18): 13057-13060, 1994.

DEWYS, W. D.; KWAAN, H. C.; BATHINA, S. Effect of defibrination on tumor growth and response to chemotherapy. **Cancer Res**, 36(10): 3584-3587, 1976.

DINARELLO, C. A. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock, **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Vol. 216: 133-165, 1996.

DU, X.-Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom l-amino acid oxidases. **Toxicon**, 40(6): 659-665, 2002.

FARSKY, S. H.; WALBER, J.; COSTA-CRUZ, M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. **Toxicon**, 35(2): 185-193, 1997.

FERNANDEZ, J.; GUTIERREZ, J. M.; ANGULO, Y.; SANZ, L.; JUAREZ, P.; CALVETE, J. J.; LOMONTE, B. Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: biochemical and toxicological characterization. **Biochimie**, 92(3): 273-283, 2010.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KNUDSEN, P. J.; DINARELLO, C. A.; STROM, T. B. Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. **J Immunol**, 137(10): 3189-3194, 1986.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, 227(5259): 680-685, 1970.

LEE, W. H.; TOYAMA, M. H.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; POLIKARPOV, I. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of piratoxin III, a D-49 phospholipase A₂ from the venom of *Bothrops pirajai*. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 55(Pt 6): 1229-1230, 1999.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat Rev Drug Discov**, 2(10): 790-802, 2003.

LOMONTE, B., ANGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, 42(8): 885-901, 2003.

LUSTER, A. D. Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. **New England Journal of Medicine**, 338(7): 436-445, 1998.

MANDELBAUM, F. R.; HENRIQUES, O. B. Purification and properties of Bothrops protease A. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 104(3): 369-374, 1964.

MANDELBAUM, F. R.; REICHEL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca). **Toxicon**, 20(6): 955-972, 1982.

MARANGONI, F. A.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; LANDUCCI, E. C. Unmasking snake venom of *Bothrops leucurus*: purification and pharmacological and

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RUDRAMMAJI, L. M. S.; GOWDA, T. V. Purification and characterization of three acidic, cytotoxic phospholipases A₂ from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. **Toxicon**, 36(6): 921-932, 1998.

SAGUCHI, K.; HAGIWARA-SAGUCHI, Y.; MURAYAMA, N.; OHI, H.; FUJITA, Y.; CAMARGO, A. C.; SERRANO, S. M.; HIGUCHI, S. Molecular cloning of serine proteinases from *Bothrops jararaca* venom gland. **Toxicon**, 46(1): 72-83, 2005.

SALVADOR, G. H. M.; CAVALCANTE, W. L. G.; DOS SANTOS, J. I.; GALLACCI, M.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Structural and functional studies with mytoxin II from *Bothrops moojeni* reveal remarkable similarities and differences compared to other catalytically inactive phospholipases A₂-like. **Toxicon**, 72(0): 52-63, 2013.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C.; BELETTI, M. E.; DE OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, 52(8): 908-917, 2008.

SARRAY, S.; DELAMARRE, E.; MARVALDI, J.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N.; LUIS, J. Lebectin and lebecetin, two C-type lectins from snake venom, inhibit alpha5beta1 and alphaV-containing integrins. **Matrix Biol**, 26(4): 306-313, 2007.

SAUTEBIN, L. Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. **Fitoterapia**, 71, Supplement 1(0): S48-S57, 2000.

SCHMITZ, J.; OWYANG, A.; OLDHAM, E.; SONG, Y.; MURPHY, E.; MCCLANAHAN, T. K.; ZURAWSKI, G.; MOSHREFI, M.; QIN, J., LI, X.; GORMAN, D. M.; BAZAN, J. F.; KASTELEIN, R. A IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST₂ and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, 23(5): 479-490, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; DA SILVA, F. M.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SILVA, F. P.; JR., IZIDORO, L. F.; FULY, A. L.; JULIANO, M. A.; DOS SANTOS, C. R.; MURAKAMI, M. T.; SAMPAIO, S. V.; DA SILVA, S. L.; SOARES, A. M. Molecular characterization of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. **Arch Toxicol**, 85(10): 1219-1233, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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