



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de Fosfolipase A<sub>2</sub> do tipo  $\gamma$  isolado no soro de *Crotalus durissus collilineatus***

**Aluna: Sarah Natalie Cirilo Gimenes**

**Orientadora: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila**

**Coorientadora: Dra. Daiana Silva Lopes**

**UBERLÂNDIA - MG**  
2013

**Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de Fosfolipase A<sub>2</sub> do tipo γ isolado do soro de *Crotalus durissus collilineatus***

**Aluna: Sarah Natalie Cirilo Gimenes**

**Orientadora: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila**

**Coorientadora: Dra. Daiana Silva Lopes**

**Disertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do  
Título de Mestre em Genética e  
Bioquímica (Área Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA - MG  
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

G491c    Gimenes, Sarah Natalie Cirilo, 1989-  
2013      Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de Fosfolipase A<sub>2</sub>  
do tipo  $\gamma$  isolado do soro de *Crotalus durissus collilineatus* / Sarah Natalie  
Cirilo Gimenes. -- 2013.  
79 p. il.  
Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.  
Co-orientadora: Daiana Silva Lopes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-  
grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Serpente peçonhenta - Veneno - Teses. 3.  
Inibidores enzimáticos - Teses. I. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues. II.  
Lopes, Daiana Silva. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de  
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

---

CDU: 577.1

**Palavras-chave:** Inibidores de PLA<sub>2</sub>, Inibidores tipo  $\gamma$ , *Crotalus durissus collilineatus*, Fosfolipases A<sub>2</sub>, Serpentes



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de Fosfolipase A<sub>2</sub> do tipo  $\gamma$  isolado do soro de *Crotalus durissus collilineatus***

**Aluna:** Sarah Natalie Cirilo Gimenes

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Orientadora Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

**Examinadores:** Prof. Dr. Andreimar Martins Soares  
Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes

**Data da Defesa:** 29 /07/2013

---

Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

## *Dedicatória*

Dedico este trabalho aos meus pais, Élcio e Suelene, minha querida irmã Ana Carolina, por todo apoio emocional e compreensão com meus momentos de impaciência nesta caminhada. O amor incondicional de vocês me tornou o que sou hoje.

Dedico ao meu lindo sobrinho, meu pequeno anjo que com seu sorriso carinhoso me garantiu a força mais pura e verdadeira capaz de superar qualquer obstáculo. Meu amor por vocês é eterno.

## *Agradecimentos*

À Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, que brilhantemente aceitou conduzir este desafio comigo. Agradeço por todo aprendizado que adquiri neste período. O meu eterno obrigado por depositar em mim confiança, isso faz de você um grande exemplo.

À Dra. Daiana Silva Lopes, que me coorientou neste trabalho. Agradeço por seus ensinamentos, cada palavra de apoio e incentivo no trabalho, por ter me acompanhado de perto nos experimentos. Isso demonstra a grande pesquisadora que é.

Ao Msc. Francis Barbosa Ferreira que ensinou pacientemente os meus primeiros passos dentro do laboratório.

Às Profas. Dras. Maria Ines Homs-Brandeburgo e Amélia Hamaguchi, que desde o começo me deram apoio com ideias e ensinaram o amor à bioquímica. À Profa. Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneama Tadini pelos valiosos conselhos.

À Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues, por toda sua ajuda nos resultados, ideias preciosas, palavras de apoio, mesmo antes de se juntar ao nosso grupo sempre disposta a contribuir. Sua valiosa ajuda será muito bem vinda na sequência deste trabalho.

Profa. Dra. Vera Lúcia de Campos Brites por nos ceder e classificar as serpentes. Sempre solícita a contribuir com informações novas e ricas, muito obrigada por ter sempre deixado as portas abertas. Nossos resultados não seriam possíveis sem sua colaboração. Agradecimento também aos técnicos responsáveis pelo setor de répteis, Eduardo e Graciele, por manter os animais em ótimas condições.

Ao Prof. Dr. André Luis Quagliato, que desde o início da ideia nos apoiou, sempre solícito para as coletas de sangue. Seu brilhante conhecimento na anatomia dos répteis garantiu nosso sucesso.

Agradecimento especial à equipe do Serviço de Bioquímica de Proteínas de Venenos Animais-FUNED, Belo Horizonte, por me receberem tão bem. Em especial Profa. Dra. Marta do Nascimento Cordeiro, por sua valiosa troca de experiência em cromatografias; a Msc. Jomara Gonçalves, por me guiar gentilmente em todos os experimentos no instituto e a Profa. Dra. Márcia Helena Borges, por ter aceitado me receber em seu laboratório e contribuir no

crescimento dos meus conhecimentos científicos. O que aprendi com vocês levarei comigo para sempre.

Ao Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes, do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural-UNESP e em especial a Dra. Juliana Izabel dos Santos que aceitaram conduzir parte dos experimentos estruturais, importantes no enriquecimento deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais, Tianinha e Marina Lima por toda colaboração com os materiais e manutenção da organização em nosso laboratório.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais, Vitor, Makswel, Fernanda, Denise, Isabela, Guilherme, Lino, David, Márcia, Dayane, Débora, Letícia, Ana Carolina, Thais, por toda ajuda durante as coletas de sangue e pelos momentos de descontração.

Às agências de fomento, FAPEMIG, por financiar minha bolsa, CAPES, INCT-Nanobiofarm e CNPq pelo financiamento direto e indireto neste trabalho.

Agradeço em especial a todos que de forma pessoal me ajudaram durante este período, cada um do seu jeito, com sua forma de carinho fizeram o diferencial nos momentos felizes e momentos difíceis durante estes anos. Todos são a prova de como uma amizade verdadeira começa com uma boa gargalhada.

À Veri, por todos os momentos de carinho, com suas palavras confortantes e revigorantes que não me deixaram perder em momento algum a esperança em grandes resultados. Hoje, após anos de convivência posso garantir que meu crescimento e amadurecimento pessoal e profissional tiveram sua participação. Seu espaço no meu coração é eterno, minha mãe científica, você tem minha admiração e orgulho, meu grande exemplo.

Dai froor, minha grande amiga e conselheira, você não imagina o quanto nossa amizade me fez crescer. Desde aquela conversa no lab da veterinária, que desabafei o que me afligia, antes mesmo da nossa amizade fortalecer, talvez não se lembre, mas foi algo muito significativo. Suas palavras me iluminaram, me guiaram em um novo caminho e a partir daquele instante percebi que poderia contar contigo para sempre. Cada vez que falo “Amiga estou em crise”, tenho a certeza de que você tem o conselho ou puxão de orelha certo para me dar. Como aprendi direitinho, vou parar de falar um pouco, rsrs. Você é um ser de luz e agradeço por ter a oportunidade de conviver com essa luz todos os dias.

Carol minha marmotinha. Miiiigs, muito obrigada por sua amizade e me aguentar por tantos anos. Você tem sempre a palavra e a solução certa, passamos por tantos perrengues e zicas que tenho certeza que nossa amizade é eterna. Palavras não são suficientes para demonstrarem todo meu carinho.

Thais, amiga obrigada por todos os momentos de alegria, apoio, conversas, discussões filosóficas e conselhos. Nunca esqueça o quanto você é especial para mim. Mesmo brigando de hora em hora e me irritando sua amizade tem valor insubstituível.

Isa, minha ic preferida, rsrs. Obrigada por todos os momentos de descontração que só você é capaz de proporcionar (sempre que eu estiver triste vou lembrar do kiwi para voltar a sorrir...hahahaha). Mulher, ter você por perto é a prova de que amizades somam as alegrias e dividem as tristezas.

Marininha meu agradecimento a você vai além dos auxílios no laboratório, obrigada amiga por cada abraço e conversa desabafantes. Obrigada ainda mais por descobrir meu dom para a música, kkkkkk. Se nada der certo, tenho certeza que meu espacinho na rock band estará lá. Conte comigo sempre.

Finalmente ao Tiii Francis, muito obrigadaa, grande parte deste resultado não seria possível sem sua participação. Talvez você não saiba e eu nunca tenha dito, mas sou eternamente grata a você por tudo que me ajudou, aconselhou, ensinou. Você é um dos exemplos que tenho a seguir.

# Sumário

Lista de Tabelas .....	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiii
Resumo.....	1
Apresentação .....	3
<b>Capítulo 1</b> .....	<b>5</b>
1.0 Fundamentação Teórica .....	5
1.1 Serpentes: Distribuição e caracteres morfológicos da espécie <i>Crotalus durissus</i> .....	5
1.2 Epidemiologia e sintomatologia do envenenamento ofídico.....	7
1.3 Composição da peçonha de serpentes .....	9
1.4 Fosfolipase A <sub>2</sub> (PLA <sub>2s</sub> ): Classificação e catálise.....	11
1.5 PLA <sub>2s</sub> (Estrutura e função).....	15
1.6 Inibidores Naturais de PLA <sub>2s</sub> .....	17
1.6.2 Mecanismo de ação dos inibidores de PLA <sub>2s</sub> .....	20
1.6.3 Processo de regulação endógena dos inibidores e filogenia presente no grupo $\gamma$ .....	23
1.6.4 Potencial terapêutico dos PLIs.....	25
Referências .....	27
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>38</b>
Resumo.....	38
<b>2.0 Material e Animais</b> .....	<b>43</b>
2.1 Reagentes.....	43
2.2 Peçonha e toxinas.....	43
2.3 Obtenção do soro.....	43
2.4 Animais .....	44
<b>3.0 Métodos</b> .....	<b>44</b>
3.1 Isolamento do inibidor de fosfolipase A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ) presente no soro da serpente <i>Crotalus durissus colillineatus</i> .....	44
3.1.1 Cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose <i>fast flow</i> .....	44

3.1.2 Cromatografia de afinidade .....	45
3.1.3 Cromatografia líquida de alta performance em fase reversa ( <i>RP-HPLC</i> )	46
3.2 Dosagem protéica .....	46
3.3 Caracterização Bioquímica .....	46
3.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes ( <i>SDS-PAGE</i> ).....	46
3.3.2 Determinação da massa MALDI-TOF .....	47
3.4 Caracterização Estrutural.....	48
3.4.1 Análise automatizada da sequencia de aminoácidos.....	48
3.4.2 Espectrometria de massas (MALDI TOF/TOF) e Análise de Bioinformática .....	48
3.4.3 Dicroísmo circular (CD) .....	49
3.4.4 Análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) .....	50
3.5. Estudos de inibição das atividades biológicas de PLA <sub>2</sub> s.....	50
3.5.1 Atividade Fosfolipásica A <sub>2</sub> .....	50
3.5.2 Atividade citotóxica .....	51
3.5.3 Atividade Miotóxica por dosagem de Creatina Cinase.....	51
3.6 Análises estatísticas.....	52
<b>4.0 Resultados</b> .....	<b>52</b>
4.1 Isolamento e caracterização bioquímica do inibidor de PLA <sub>2</sub> tipo $\gamma$ .....	52
4.2 Estudos funcionais .....	59
4.2.1 Atividade fosfolipásica A <sub>2</sub> .....	59
4.2.2 Neutralização da atividade Miotóxica (Dosagem CK) .....	61
4.2.3 Neutralização da citotoxicidade de células tEnd induzidas pela PLA <sub>2</sub> BnSP-7.....	62
4.3 Estudos estruturais .....	63
4.3.1 Determinação da estrutura primária parcial do inibidor.....	63
4.3.2 Dicroísmo circular (CD) .....	69
4.3.2.1 Análises de CD do inibidor .....	69
4.3.2.2 Complexo Inibidor – Enzima .....	69
4.3.3 Análises de espalhamento de luz dinâmico .....	70
<b>6.0 Conclusão</b> .....	<b>76</b>
<b>Referências</b> .....	<b>77</b>

## Lista de Figuras

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1-</b> Distribuição e tendências evolutivas da cascavel Sulamericana .....	<b>06</b>
<b>Figura 2-</b> Espécimes da subespécie <i>Crotalus durissus collilineatus</i> utilizados na pesquisa.....	<b>07</b>
<b>Figura 3-</b> Transcriptoma da glândula de peçonha da serpente <i>C. durissus collilineatus</i> .....	<b>11</b>
<b>Figura 4-</b> Mecanismo catalítico de PLA <sub>2</sub> s.....	<b>14</b>
<b>Figura 5-</b> Representação do sítio de ligação com cálcio.....	<b>15</b>
<b>Figura 6-</b> Modelo de variantes Lys49-PLA <sub>2</sub> e interação com a membrana de células musculares.....	<b>16</b>
<b>Figura 7-</b> Modelo teórico trimérica do inibidor $\alpha$ BaltMIP.....	<b>19</b>

### CAPÍTULO 2

<b>Figura 1-</b> Fracionamento de 120 mg do soro de <i>Cdc</i> em coluna Q-Sepharose.....	<b>54</b>
<b>Figura 2-</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) em condições desnaturantes do soro de <i>Cdc</i> e frações obtidas da cromatografia em Q-sepharose.....	<b>55</b>
<b>Figura 3A-</b> Perfil cromatográfico de 500 $\mu$ g da fração Q4 em coluna de afinidade NHS imobilizada com a PLA <sub>2</sub> BnSP-7.....	<b>56</b>
<b>Figura 3B-</b> SDS PAGE (12%) em condições redutoras das frações obtidas em cromatografia de afinidade.....	<b>56</b>
<b>Figura 4A-</b> Perfil cromatográfico do inibidor $\gamma$ CdcPLI em coluna RP-C4 Vydac.....	<b>57</b>

<b>Figura 4B-</b> SDS-PAGE (12%) em condições redutoras do $\gamma$ CdcPLI em RP-C4.....	<b>57</b>
<b>Figura 5-</b> Análises em espectrofotômetro de massas tipo duplo TOF com fonte MALDI (MALDI-TOF/TOF).....	<b>58</b>
<b>Figura 6-</b> Neutralização da atividade mitotóxica por dosagem de Creatina Quinase (CK) .....	<b>61</b>
<b>Figura 7-</b> Inibição da citotoxicidade induzida.....	<b>62</b>
<b>Figura 8-</b> Espectro dos fragmentos utilizados no sequenciamento por MS/MS.....	<b>64</b>
<b>Figura 9-</b> Sequência parcial do inibidor $\gamma$ CdcPLI .....	<b>66</b>
<b>Figura 10-</b> Alinhamento da seqüência do inibidor $\gamma$ CdcPLI e outros inibidores .....	<b>68</b>
<b>Figura 11-</b> Espectro de Dicroísmo Circular do inibidor $\gamma$ CdcPLI .....	<b>69</b>
<b>Figura 12-</b> Espectro obtido do Dicroísmo Circular .....	<b>70</b>

## Lista de Tabelas

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1-</b> Exemplos de inibidores de PLA <sub>2</sub> S purificados em diferentes origens.....	<b>17</b>
--	-----------

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1-</b> Rendimento proteico do inibidor obtido no fracionamento do soro de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> em Q-Sepharose e Hitrap NHS.....	<b>59</b>
---	-----------

<b>Tabela 2-</b> A atividade PLA <sub>2</sub> realizada por titulação potenciométrica .....	<b>60</b>
---	-----------

<b>Tabela 3-</b> Dados de Espalhamento Dinâmico de Luz para $\gamma$ CdcPLI, cujas medidas foram feitas com a amostra diluída em tampão PBS 1x (150mM).....	<b>71</b>
---	-----------

<b>Tabela 4-</b> Dados de Espalhamento Dinâmico de Luz para $\gamma$ CdcPLI, cujas medidas foram feitas com a amostra diluída em água.....	<b>71</b>
--	-----------

## Lista de Abreviaturas

ABNT- Associação Brasileira de Normas técnicas

ACN – Acetonitrila

CA – Subunidade A da crotoxina

CACB – Complexo crotoxina

CB – Subunidade B da crotoxina

CD – *Circular Dichroism*

CEUA – Comitê de Ética em Utilização Animal

CK – *Creatine Kinase*

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX2 – Cicloxigenase 2

cPLA<sub>2</sub> – Fosfolipase A<sub>2</sub> citosólica

CRD – Domínio de Reconhecimento de Carboidrato

DLS – *Dynamic Light Scattering*

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*

HPLC – *High-performance liquid chromatography*

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

*im* – intramuscular

iPLA<sub>2</sub> - Fosfolipase Cálcio independente

LAPAS – Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres

LBME – Laboratório de Biologia Molecular Estrutural

MALDI TOF – *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*

MTT – *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*

NHS - *N-hydroxysuccinimide*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAF-AH – Acetilhidrolases fator de agregação plaquetária

PBS – *Phosphate Buffer Saline*

PLA<sub>2</sub> – Fosfolipase A<sub>2</sub>

PLIs – Inibidor de Fosfolipase A<sub>2</sub>

PMF – *Peptide Mass Fingerprinting*

RP-HPLC – *Reverse Phase-High-performance liquid chromatography*

SBH- Sociedade Brasileira de Herpetologia

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

sPLA<sub>2</sub> – Fosfolipase A<sub>2</sub> secretória

TEMED – *Tetramethylethylenediamine*

tEnd – *Thymic endothelium*

TFA – Ácido Trifluoroacético

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

UNESP – Universidade Estadual Paulista

α-CHCA – ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico

αPLI – Inibidor de PLA<sub>2</sub> da classe α

βPLI – Inibidor de PLA<sub>2</sub> da classe β

γPLI – Inibidor de Fosfolipase da classe γ

## **Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de Fosfolipases A<sub>2</sub> do tipo $\gamma$ isolado do soro de *Crotalus durissus collilineatus***

**Resumo:** Alguns animais apresentam uma resistência natural aos efeitos tóxicos induzidos por peçonha de serpentes, isto se deve a presença de inibidores naturais endógenos em seu plasma. Dentre estes, destacam-se os inibidores de fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), os quais são capazes de inibir as atividades enzimáticas e farmacológicas de várias PLA<sub>2</sub>s de peçonhas ofídicas. No presente trabalho, foi demonstrado o isolamento, a caracterização bioquímica e estrutural de um inibidor de PLA<sub>2</sub>, o qual foi isolado do soro da serpente *Crotalus durissus collilineatus* (*Cdc*) por dois passos cromatográficos. Inicialmente o soro de *Cdc* foi aplicado em uma coluna de troca-iônica Q-Sepharos, produzindo seis picos de absorbância a A<sub>280nm</sub> denominados (Q1 a Q6). Posteriormente, a fração Q4, que demonstrou melhores resultados de inibição foi submetida a uma cromatografia de afinidade NHS–Hitrap imobilizada com uma PLA<sub>2</sub>-símile (BnSP-7). Deste fracionamento resultaram duas frações denominadas de NHS-1 e NHS-2, sendo que a fração NHS-2 representa o inibidor de PLA<sub>2</sub> denominado  $\gamma$ CdcPLI. A massa molecular do inibidor determinada por (MALDI-TOF) foi de 22.34 kDa e a sequência primária parcial determinada por Edman e *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) em MS (MALDI-TOF/TOF) mostrando similaridade com outros inibidores do tipo  $\gamma$ . As análises da estrutura secundária realizada por dicróismo circular revelaram aproximadamente 22% de alfa hélices e 29% de folhas beta. Estes estudos também indicaram que não houve alteração significativa na conformação tanto do  $\gamma$ CdcPLI ou da PLA<sub>2</sub>-símile BnSP-7. Os resultados obtidos por análises de espalhamento de luz dinâmico demonstraram que o inibidor possui comportamento de oligomerização mediante variação de temperatura e quando dissolvido em H<sub>2</sub>O ou PBS. O  $\gamma$ CdcPLI foi capaz de inibir as atividades enzimática com resultado de 100% na razão 1:5 (m/m) frente as PLA<sub>2</sub> utilizadas, miotóxica por dosagem de CK e citotóxica por MTT em células tEnd com característica de ser dose não dependente. Estudos estruturais e funcionais deste inibidor poderão contribuir para a compreensão dos mecanismos de ação dos inibidores de PLA<sub>2</sub>s, bem como na investigação de seu uso como auxiliar no tratamento do envenenamento ofídico ou doenças inflamatórias.

**Palavras-chave:** Inibidores de PLA<sub>2</sub>, Inibidores tipo  $\gamma$ , *Crotalus durissus collilineatus*, Fosfolipases A<sub>2</sub>, Serpentes

**Abstract:** Some animals have a natural resistance to toxic effects induced by snake venom due to presence of natural endogenous inhibitors in their plasma. Snake venom contains inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) that inhibit the enzymatic and pharmacological activities of PLA<sub>2</sub>. In this work we show the isolation, structural and biochemical characterization of a new PLA<sub>2</sub> inhibitor from *Crotalus durissus colillineatus* (Cdc) snake serum by two chromatographic steps. Initially, the Cdc serum was applied to a column of ion exchange Q-Sepharose Fast Flow, producing six peaks of absorbance at A280nm (Q1 to Q6). Subsequently, Q4 fraction (best results to inhibition) was applied to affinity chromatography with immobilized HiTrap NHS-BnSP-7. This fractionation resulted in two fractions (NHS-1 and NHS-2) the second fraction contained the inhibitor, named **γCdcPLI**. The molecular mass of **γCdcPLI** determined by MALDI-TOF was 22.3kDa and the primary partial structure obtained by Edman and peptide mass fingerprinting (PMF) MS (MALDI-TOF \ TOF), showed similarity when compared with the sequences of other related inhibitors. The secondary structure was evaluated for circular dichroism and showed approximately 22% alpha helix and 29% beta sheets. These studies of interaction have also indicated no significant changes in secondary structure to γCdcPLI and BnSP-7. The results obtained by analysis of dynamic light scattering (DLS) showed that the inhibitor has in oligomerization variation, according to temperature and when dissolved in H<sub>2</sub>O or PBS. γCdcPLI was able to inhibit the enzymatic, with 100% to inhibition. Cytotoxicity was assayed on Murine endothelial cell line derived from thymus hemangioma- tEnd to MTT and myotoxicity was measuring by creatine kinase (CK) showed inhibition too, but in this case the inhibition was independent dose. Structural and functional studies of this inhibitor may contribute to understanding the mechanisms of action of PLA<sub>2</sub> inhibitors. In addition, these studies may serve as starting point for investigating the potential of these inhibitors for the treatment of snake bite or inflammatory diseases.

**Keywords:** PLA<sub>2</sub> inhibitor, γ-type inhibitor, *Crotalus durissus colillineatus*, phospholipase A<sub>2</sub>, snakes

# Apresentação

Os acidentes ofídicos em abril de 2009 foram incluídos na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS), afetando, áreas rurais de países da África, Ásia, Oceania e América Latina e os números de ocorrências e mortes aumentaram nos últimos anos. O quadro clínico de envenenamento ofídico varia em sua potência e progressão de acordo com a quantidade de peçonha inoculada, o local, idade e tamanho da serpente, além do tempo para o atendimento. Os acidentes botrópicos são caracterizados principalmente por apresentarem sintomatologia local, com edema, hiperalgesia, hemorragia e necrose. No caso de acidentes crotálicos a sintomatologia mais expressa é o aparecimento de neuroparalisias, como ptose palpebral, turvação visual e oftalmoplegia, tornando estes casos mais letais.

As peçonhas de serpentes são consideradas as misturas mais complexas da natureza. São compostas em sua maior parte por proteínas tóxicas e podem atuar em suas vítimas de forma isolada ou em sinergia. Muitas destas proteínas apresentam um grande potencial farmacológico, podendo ser utilizadas como modelos na produção de fármacos no tratamento de diversas doenças, como em processos inflamatórios desencadeados por fosfolipases  $A_2$ , sendo estas abundantes na peçonha.

São reconhecidos diversos fatores de neutralização de  $PLA_2$ s, dentre eles os inibidores endógenos de  $PLA_2$ s (PLIs), que constituem um importante mecanismo contra os efeitos tóxicos da peçonha. Estes inibidores podem ser classificados em três classes  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  de acordo com seus aspectos estruturais.

Neste trabalho foi isolado e caracterizado química, estrutural e funcionalmente um inibidor do tipo  $\gamma$  presente no soro de *Crotalus durissus collilineatus*. Este estudo foi o primeiro a descrever um inibidor nesta subespécie, além de demonstrar sua grande capacidade inibitória, bem como compreender algumas propriedades de oligomerização e identificar sua possível utilização como modelo para fármacos contra processos inflamatórios.

A apresentação deste trabalho foi realizada seguindo as normas do curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia – MG e da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT). Este foi dividido em dois capítulos, sendo que o Capítulo 1 consiste na Fundamentação Teórica descrevendo aspectos importantes no entendimento, relevância e objetivo do estudo. O Capítulo 2 apresenta um artigo intitulado: “**Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de Fosfolipases A<sub>2</sub> do tipo  $\gamma$  isolado do soro de *Crotalus durissus collilineatus***”, nos moldes do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica e da ABNT.

# Capítulo 1

## 1.0 Fundamentação Teórica

### 1.1 Serpentes: Distribuição e caracteres morfológicos da espécie *Crotalus durissus*

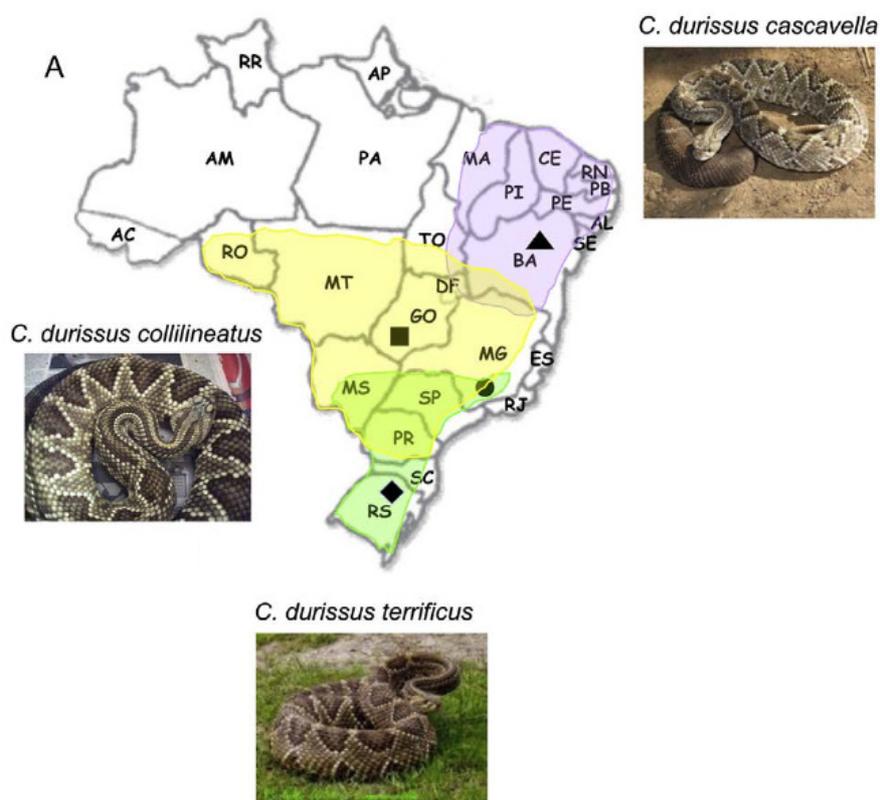
De acordo com Sociedade Brasileira de Herpetologia (BÉRNILS, 2012), são reconhecidas aproximadamente 2.900 espécies de serpentes em todo o mundo, com distribuição em 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil há 386 espécies, divididas em 70 gêneros e 10 famílias, sendo que apenas duas destas famílias são consideradas peçonhentas, a saber: Elapidae e Viperidae. Estas famílias compreendem cerca de 70 espécies, as quais estão distribuídas entre os gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* (Elapidae) e *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Lachesis* e *Crotalus* (Viperidae).

O gênero *Crotalus*, representa um clado monofilético, no qual acredita-se ter sua origem nas florestas Ocidentais de Sierra Madre no planalto centro-norte mexicano. Esta origem é datada de vários milhões de anos depois que uma única linhagem Asiática ter cruzado para a América do Norte através do estreito de Behring, no Oligoceno ou início do Mioceno (GLOYD, 1940; BRATTSTROM, 1964; KNIGHT *et al.*, 1993; KLAUBER, 1997; PLACE, 2004; CASTOE *et al.*, 2009). A dispersão deste gênero por todo o continente americano consolidou a diversidade encontrada atualmente, com cerca de 70 espécies e subespécies, registradas do sul do Canadá ao norte da Argentina (KLAUBER, 1971; CAMPBELL, 2004; HOSER, 2009).

No Brasil, o gênero *Crotalus* é representado por uma única espécie, *Crotalus durissus* (WÜSTER *et al.*, 2005). Dados biogeográficos sugerem uma recente dispersão sulamericana de *C. durissus* através de um corredor central na Amazônia durante o Pleistoceno médio, seguido por um processo de vicariância e dispersão no Nordeste do Brasil (WÜSTER *et al.*, 2005; QUIJADA-MASCAREÑAS, 2007).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH), são reconhecidas no Brasil sete subespécie de *C. durissus* (*C. d. dryinas*, *C. d.*

*marajoensis*, *C. d. ruruima*, *C. d. trigonicus*, *C. d. terrificus*, *C. d. cascavella* e *C. d. collilineatus*). É importante ressaltar a distribuição e a interocorrência das subespécies *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus terrificus*, apenas nos estados de São Paulo, Paraná, sul de Minas Gerais e leste de Mato Grosso, reforçando as diferenças populacionais e isolamento territorial de *Crotalus durissus collilineatus* na região do Triângulo Mineiro (FIGURA 1). (BÉRNILS e COSTA, 2012)



**Figura 1:** Distribuição e tendências evolutivas entre a cascavel Sulamericana. (A) A distribuição geográfica de *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus* no Norte, Centro-Oeste e Sul do Brasil, respectivamente. FONTE: Modificado de Boldrini-França, 2010.

Além destes dados sobre a distribuição territorial, as duas principais cascavéis da região Sul-Sudeste do Brasil (*C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus*) podem ser diferenciadas por caracteres morfológicos. Dessa forma, a subespécie *Crotalus durissus terrificus* possui um desenho notório de faixas longitudinais na região da nuca, seguido de manchas rombóides contrastantes com a cor de fundo. Nos centros destas manchas raramente são encontradas manchas

ligeiramente claras. A subespécie *Crotalus durissus collilineatus* compartilha as faixas longitudinais na região da nuca característica do gênero, porém em contrapartida apresenta o centro das manchas rombóides visivelmente mais claros, destacando-se em contraste com o resto do corpo (FIGURA 2). Além disso, outras características morfológicas diferenciam as subespécies de *Crotalus durissus* (CAMPBELL e LAMAR, 1989), facilitando sua identificação.



**Figura 2:** Espécimes da subespécie *Crotalus durissus collilineatus* utilizados na condução da pesquisa. Destaque para centro das manchas rombóides visivelmente mais claros, característica morfológica principal da subespécie. Universidade Federal de Uberlândia, Setor de Manutenção de Répteis - CRIADOURO CONSERVACIONISTA DA FAUNA SILVESTRE- FINALIDADE CIENTÍFICA.

## 1.2 Epidemiologia e sintomatologia do envenenamento ofídico

De acordo com o Ministério da Saúde, estima-se que os acidentes ofídicos afetam mais de 2,5 milhões de pessoas anualmente. No Brasil foram registrados, em 2010, 29.635 acidentes por serpentes, dentre os quais 85% foram ocasionados por serpentes peçonhentas, 4% por não-peçonhentas e 11% por serpentes não identificadas. Em um levantamento dos últimos 12 anos, os casos notificados de acidentes ofídicos tiveram aumento progressivo durante este período, sendo que o ano de 2011 teve o maior índice já registrado 30.836 casos. Neste mesmo período o número de óbitos demonstrou aumento até o ano de 2003 com 123 casos, nos anos subsequentes os números apresentaram oscilações, sendo que no ano de 2010 147 casos resultaram em óbitos (BRASIL, 2013).

A epidemiologia dos acidentes ofídicos revela um perfil de vítimas preferencialmente do sexo masculino, trabalhadores rurais com idade entre 15 e 49 anos, sendo atingidos, principalmente, em seus membros inferiores. Os acidentes por serpentes peçonhentas são caracterizados por uma sazonalidade marcante, com picos de ocorrências no início e no final do ano (BOCHNER; STRUCHINER, 2003), durante períodos mais chuvosos e quentes no país, coincidindo com a época de maior atividade humana no campo. Além disso, esta sazonalidade pode ser explicada pelo hábito dos animais que, nestas épocas do ano estão em busca de alimentos, parceiros reprodutivos, locais para procriar e/ou controle da temperatura corporal. Esta busca por controle de temperatura corporal é explicada por serem animais ectotérmicos, dessa forma, à ocorrência dos acidentes ofídicos ocorre principalmente em dias quentes e em regiões com temperaturas altas (BRASIL, 2013).

Os registros de acidentes são principalmente atribuídos aos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, sendo que este último é responsável pelos maiores índices de letalidade dos acidentes ofídicos registrados no Brasil. Entretanto, os acidentes com o gênero *Bothrops* são os casos com maiores danos teciduais locais (CARDOSO, 2003), constituindo assim uma grave problemática de saúde pública.

A sintomatologia do acidente crotálico é caracterizada por apresentar manifestações locais sem alterações significativas, dor e edema são usualmente discretos e restritos ao redor da picada; eritema e parestesia são comuns. As manifestações sistêmicas consistem no aparecimento de neuroparalisias, inicialmente por ptose palpebral, turvação visual e oftalmoplegia. Podem ocorrer também o aparecimento de distúrbios no olfato e paladar, além de ptose mandibular e sialorreia. Tais manifestações tendem a regredir lentamente, sendo totalmente reversíveis após tratamento adequado. Alguns casos apresentam gengivorragia e outros sangramentos discretos, em decorrência da ação das miotoxinas presente na peçonha. Estas são capazes de destruir as mioglobulinas musculares, que ao serem filtradas pelos rins e excretadas na urina deixam a mesma com forte coloração avermelhada (BRASIL, 2013).

### 1.3 Composição da peçonha de serpentes

Estima-se que a peçonha das serpentes seja a mais complexa dentre as peçonhas do reino animal, devido sua riqueza de componentes e propriedades tóxicas que a compõe (DALMORA, 1992). Sua composição se baseia em uma mistura de proteínas com ou sem propriedade enzimática, dentre estas destacam as fosfolipases  $A_2$ , proteases, hialuronidasas, L-aminoácido oxidases, acetilcolinesterases, ativadores de proteína C, lectinas, peptídeos (potencializadores de bradicinina e desintegirinas). Além dos compostos proteicos as peçonhas possuem uma constituição por componentes não proteicos como os compostos orgânicos de baixo peso molecular, dentre eles os carboidratos, serotonina, histamina, citrato e nucleosídeos. Por fim é descrito na peçonha a presença de íons inorgânicos como cálcio, cobalto, magnésio, cobre, ferro, potássio e alguns inibidores enzimáticos (RAMOS, SELISTRE DE ARAÚJO, 2006).

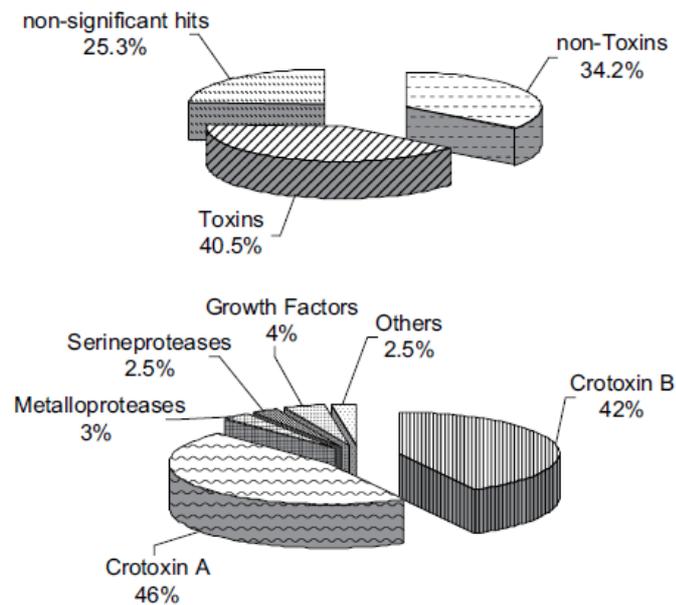
Pode-se dizer que a presença da peçonha em serpentes refere a uma adaptação evolutiva convergente (FRY *et al.*, 2006, 2008), considerando que a glândula de peçonha outrora no caminho evolutivo era equivalente a glândulas salivares, presente em outras espécies. Dessa forma a peçonha compõe um poder bioquímico adaptada para atuar nos sistemas vitais de presas destes animais, agindo de forma a imobilizar, matar e iniciar a sua digestão (MACKESSY *et al.*, 2003).

A composição da peçonha crotálica difere em relação à botrópica, o que justifica diferenças notáveis na sintomatologia do envenenamento causado por estes gêneros. A peçonha crotálica é capaz de bloquear a transmissão neuromuscular e provocar mialgia, levando o paciente a sintomas de paralisia progressiva. Do ponto de vista sistêmico, a neurotoxicidade é frequentemente acompanhada de rabdomiólise com necrose tubular aguda e insuficiência renal, tal característica do envenenamento representa a principal causa de óbitos (VITAL-BRAZIL, 1966; AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2009). Estas características únicas do envenenamento crotálico, são atribuídas à elevada concentração de crotoxina (WARRELL, 2004), uma  $PLA_2$  heterodimérica que exibe ação pré sináptica (BON, 1989; BON, 1997; SAMPAIO *et al.*, 2010), esta representa

normalmente 70-90% da composição proteica da peçonha de *C. durissus* (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2009; CALVETE *et al.*, 2010).

Além da crotoxina, a peçonha crotálica apresenta quantidades variáveis de crotamina, que age nos canais de Na<sup>+</sup>. Além destes exemplos, encontra-se também na peçonha crotálica componentes diversos, tais como a giroxina, uma serino protease; a crotalfina, um peptídeo com ação analgésica; a convulxina, uma lectina tipo-C indutora de agregação plaquetária, dentre outras. (CHANG, 1978; JANDROT-PERRUS *et al.*, 1998; OGUIURA *et al.*, 2005; BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2009; RÁDIS-BAPTISTA; KERKIS, 2011). A figura 3 apresenta os resultados de estudos de transcriptoma da glândula de peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*. Esta mostra a proporção relativa destes compostos na peçonha, evidenciando a grande representatividade da crotoxina.

A crotoxina, uma PLA<sub>2</sub> conhecida como principal componente tóxico da peçonha crotálica, (HENDON, 1971; RÜBSAMEN, 1971) possui uma subunidade tóxica CB (PLA<sub>2</sub>) e uma subunidade não-tóxica e não-enzimática ácida, CA (denominada de crotapotina) (FRAENKEL-CONRAT *et al.*, 1980; FAURE, 1988; FAURE *et al.*, 1991). Este complexo heterodimérico CACB formado é o grande responsável pela toxicidade da peçonha. Vale destacar que a subunidade CA aumenta potencialmente a letalidade proporcionada pela PLA<sub>2</sub>, participando com a subunidade CB na formação de um complexo ternário, que proporciona a ligação da crotoxina em membranas pré-sinápticas. Após esta ligação, há a liberação da subunidade CA. (KRIZAJ, 1997; DUNN, 2001).



**Figura 3:** Transcriptoma da glândula de peçonha da serpente *C. durissus collilineatus*. Mostrando a proporção relativa de compostos tóxicos e não-tóxicos na peçonha, além da proporção dos grupos de toxinas presentes nos transcritos. FONTE: Boldrini-França *et al.*, 2009.

#### 1.4 Fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s): Classificação e catálise

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s E.C. 3.1.1.4) são enzimas de interesse médico científico por estarem relacionadas a uma grande variedade de doenças inflamatórias humanas e nos envenenamentos ofídicos. Estas desempenham importantes papéis no catabolismo de lipídeos da dieta e no metabolismo geral de lipídeos estruturais de membranas celulares. Elas foram ultimamente identificadas e caracterizadas em tecidos de mamíferos e peçonha de artrópodes e serpentes (GARCIA-DENEGRI *et al.*, 2010).

As PLA<sub>2</sub>s hidrolisam especificamente a ligação 2-acil éster de 2-*sn*-fosfolipídeos, liberando ácidos graxos livres e lisofosfatídeos (ARNI e WARD, 1996; KINI *et al.*, 2003). Os ácidos graxos liberados, como o ácido araquidônico, são precursores dos eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanas, prostaciclina e leucotrienos). Estes são lipídeos bioativos e potenciais mediadores da inflamação, dor e ativação plaquetária (DENNIS, 1997). Os lisofosfolipídeos estão relacionados com o processo de sinalização celular e na remodelagem dos fosfolipídeos de membrana. Além disso, podem atuar também como precursores de mediadores lipídicos, como ácido lisofosfatídico, relacionados com

proliferação, sobrevivência e migração celular (SIX e DENNIS, 2000; SCHALOSKE e DENNIS, 2006).

Estas enzimas são classificadas como intracelulares e extracelulares. As PLA<sub>2</sub>s intracelulares estão frequentemente associadas a membranas e envolvidas com o metabolismo de fosfolípidos e outras funções celulares (MUKHEERJEE *et al.*, 1994). As extracelulares são amplamente distribuídas em secreções pancreáticas, exudados inflamatórios e em especial nas peçonhas de serpentes (DENNIS, 1994).

As PLA<sub>2</sub>s são encontradas em diversos organismos vivos e podem ser divididas em cinco grupos fundamentais: secretórias (sPLA<sub>2</sub>), citosólicas (cPLA<sub>2</sub>), Ca<sup>2+</sup> independentes (iPLA<sub>2</sub>), PAF acetilhidrolases (fator de ativação agregação plaquetária) e as lisossômicas (SCHALOSKE e DENNIS, 2006). A divisão das PLA<sub>2</sub>s está baseada em sua estrutura primária e a designação é estabelecida seguindo a numeração romana e por letras arábicas (CUMMINGS, 2007). Este sistema de classificação agrupa as fosfolipases A<sub>2</sub> conforme a sequência de aminoácidos, origem, mecanismo catalítico e suas peculiaridades estruturais e funcionais.

As PLA<sub>2</sub> citosólicas (cPLA<sub>2</sub>) são caracterizadas por apresentarem massa molecular variando de 61 a 114 kDa, o sítio catalítico apresenta resíduos de Serina e Aspartato; hidrolisam preferencialmente glicerofosfolípidos contendo ácido araquidônico na posição *sn*-2 e esta catálise não dependente de Ca<sup>2+</sup>. O grupo das iPLA<sub>2</sub> cálcio independentes são classificadas por apresentarem uma massa molecular entre 28 e 146 kDa, o sítio catalítico possui um resíduo de Serina e a catálise não dependente de Ca<sup>2+</sup>. As PLA<sub>2</sub>s acetilhidrolases, conhecidas como fatores de ativação de plaquetas (PAF-AH) são abundantes no sistema nervoso central de mamíferos e plaquetas. Neste grupo o grupamento acetila na posição *sn*-2 do seu esqueleto de glicerol é essencial para a sua atividade biológica. As PLA<sub>2</sub>s lisossomais apresentam uma tríade conservada dos resíduos Ser-His-Asp e tem quatro resíduos de cisteína necessários para a atividade catalítica. Este grupo foi encontrado e purificado em cérebro bovino, sendo descritas como esterificantes de um grupo acila com o grupo hidroxila na posição C-1 de ceramida utilizando fosfolípidos como doador de grupo acila (BURKE e DENNIS, 2009). Por fim, as PLA<sub>2</sub>s secretórias, que representam o grupo mais diversificado

e bem descrito. Elas têm sua catálise dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , baixo peso molecular e possuem envolvimento descrito em processos como: digestão, mediadores lipídicos, proliferação celular, exocitose, bactericida, doenças inflamatórias, dentre outras (BURKE e DENNIS, 2009).

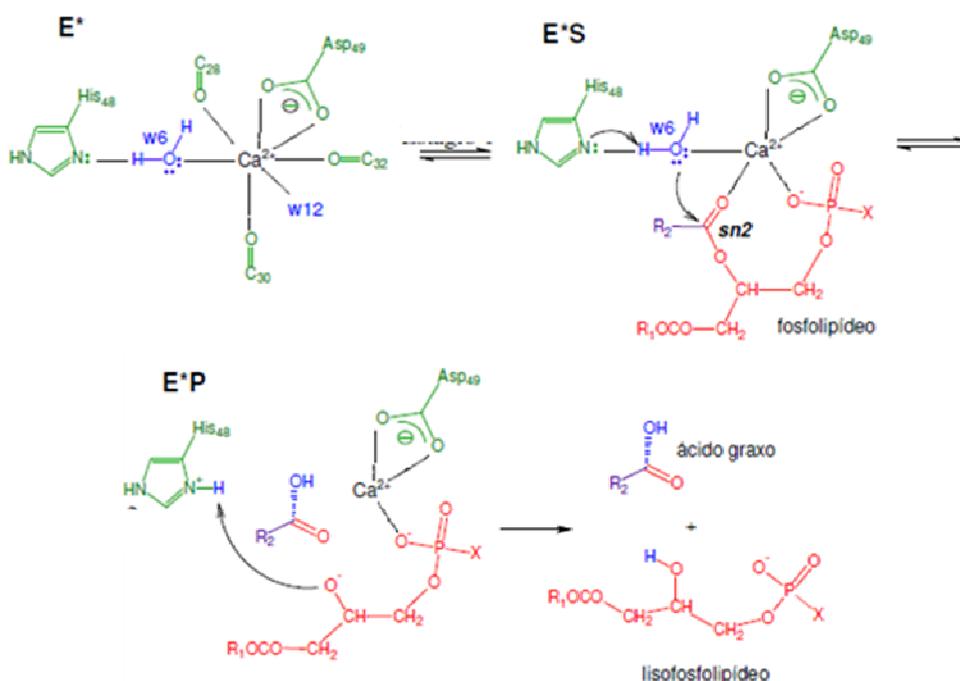
As  $\text{PLA}_2$  secretórias são distribuídas em quinze grupos de acordo com a origem, massa relativa e quantidade de ligações dissulfeto (SCHALOSKE e DENNIS, 2006). As fosfolipases  $\text{A}_2$  secretórias presentes nas peçonhas de serpentes são reunidas nos grupos I e II, e possuem cerca de 119 a 143 resíduos de aminoácidos com peso molecular variando entre 13.000 e 18.000. As enzimas da classe I são comumente encontradas em peçonhas da família Elapidae e Hydrophidae, enquanto que as pertencentes à classe II são encontradas principalmente em peçonha de serpentes da família Viperidae (WARD *et al.*, 2001).

As  $\text{PLA}_2$ s isoladas da peçonha de serpentes são subdivididas em dois grupos principais, as Asp-49 e Lys-49. Outras variantes de  $\text{PLA}_2$ s também têm sido descritas, a saber: Ser49, Asn49 ou Arg49 (OWNBY *et al.*, 1999 e KETELHUT *et al.*, 2003; KRIZAJ *et al.*, 1991; POLGAR *et al.*, 1996; TSAI *et al.*, 2004; WEI *et al.*, 2006).

É descrito que substituição de Asp por Lys na posição 49 acarreta na perda da atividade catalítica por estas enzimas. Isto acontece pelo fato de que o  $\text{Ca}^{2+}$  não consegue se ligar coordenadamente à região ligadora de cálcio das  $\text{PLA}_2$ s (SCOTT *et al.*, 1992; HOLLAND *et al.*, 1990). Porém, algum estudo com modificações sítio dirigido nas  $\text{PLA}_2$ s-símile Lys49, com substituição de Lys por Asp na posição 49, não alterou seu estado cataliticamente inativo. Este fato demonstra que a inatividade apresentada por estas enzimas está relacionada também com outras modificações estruturais (MAGRO *et al.*, 2003).

O mecanismo catalítico das  $\text{PLA}_2$  depende da presença de íons cálcio, o qual se mantém coordenado à carboxila da cadeia lateral do aspartato 49 e aos oxigênios carbonílicos dos resíduos Gly28 e Gly30, bem como a duas moléculas de água. Neste caso, o complexo, enzima-substrato, é formado a partir do deslocamento pelo fosfolípídeo de uma das moléculas de água coordenadas pelo íon cálcio presente no sítio ativo. Por meio de interações eletrostáticas, o íon cálcio polariza a carbonila na posição *sn*-2 do substrato, aumentando o caráter

eletrofílico do carbono carbonílico. Após este estágio há um ataque nucleofílico de uma molécula de água sobre a carbonila *sn*-2. Por último, ocorre uma protonação do lisofosfolípido formado, juntamente com a desprotonação do nitrogênio da histidina. Dessa forma a catálise acontece (KINI, 2003), como é demonstrado na figura 4, com esquema geral do sítio catalítico de PLA<sub>2</sub>.



**Figura 4:** Mecanismo catalítico de uma PLA<sub>2</sub>. Em que, verde: Componentes enzimáticos; Vermelho: substrato; Azul: moléculas de água; Lilás: cadeia alifática do grupo ligado à carbonila *sn*-2 do fosfolípido. Os símbolos C28, C30 e C32 se referem aos carbonos alfa dos resíduos 28,30 e 32 respectivamente. W6 e W12 representam duas moléculas de água. R1 e R2 são cadeias alifáticas quaisquer. Adaptada de Oliveira (2008).

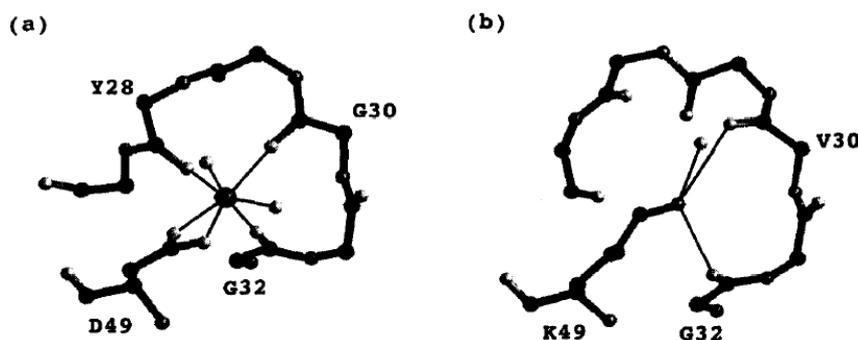
A atividade catalítica destas enzimas sobre membranas celulares de tecidos específicos sugerem um importante papel na toxicidade do envenenamento, sendo considerados grandes alvos de pesquisas com aplicação farmacológica. (ALVARADO e GUTIERREZ, 1988; LLORET e MORENO 1993; YUAN *et al.*, 1993; FULY *et al.*, 1997; PÁRAMO *et al.*, 1998; OWNBY, 1998; SOARES *et al.*, 1998; FERNARD *et al.*, 1999).

Além da atividade enzimática, as PLA<sub>2</sub>s agem sobre membranas celulares de tecidos específicos, podendo apresentar independentemente da atividade catalítica, ações farmacológicas diversas como: neurotoxicidade pré e/ou pós-

sináptica, cardiotoxicidade, efeitos na agregação plaquetária, efeitos convulsivos, atividade hipotensiva, indução de edema, hipotensão, dentre outros efeitos (KINI, 2003).

### 1.5 PLA<sub>2</sub>s (Estrutura e função)

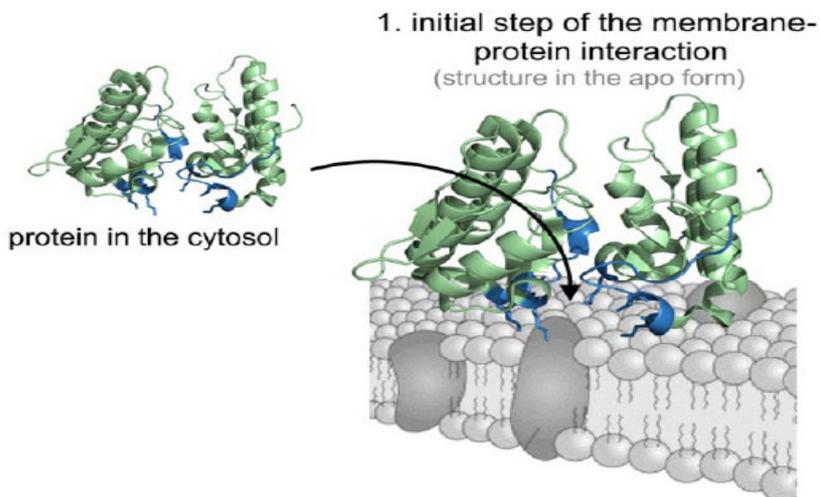
Primeiramente, estudos estruturais comparativos entre PLA<sub>2</sub> com atividade catalítica e não catalítica (Asp49 e PLA<sub>2</sub>-símile Lys49) mostraram como a mudança de aminoácidos na posição 49 da cadeia polipeptídica altera seu funcionamento. Arni e Ward (1996) demonstraram como o sítio de ligação com o cálcio é modificado pela troca de aminoácido nesta posição. O aminoácido Aspartato na posição 49 é essencial para a ligação de Ca<sup>2+</sup> e a substituição conservadora de Aspartato por Glutamato na cadeia polipeptídica resulta em uma diminuição de 12 vezes na afinidade com o cálcio. Esta mudança do sítio de ligação com cálcio é determinante na perda da função enzimática das PLA<sub>2</sub>-símile Lys49 (FIGURA 5).



**Figura 5:** Representação do sítio de ligação com cálcio em modelo em bola e bastão. No qual (a) representa o loop de ligação em PLA<sub>2</sub> Asp49 e (b) a região análoga de PLA<sub>2</sub>-símile Lys49, cataliticamente inativa. FONTE: Arni e Ward, 1996.

Foi demonstrado que a atividade miotóxica das PLA<sub>2</sub>s Lys49 está relacionada a uma ativa participação da região C-terminal neste processo (dos SANTOS *et al.*, 2011). Alguns estudos com peptídeos sintéticos com variantes da Lys49 demonstraram que este seja o provável sítio farmacológico responsável pelos danos celulares (GUTIÉRREZ *et al.*, 1995; WARD *et al.*, 2002; CHIOATO *et al.*, 2002; LOMONTE *et al.*, 2003). A figura 6 demonstra, por meio de estudos

cristalográficos um modelo hipotético de interação entre a região C-terminal e a membrana plasmática, sugerindo este mecanismo para a ação de PLA<sub>2</sub>s.



**Figura 6:** Modelo de variantes PLA<sub>2</sub>-símile Lys49 interação com a membrana de células muscular. A região C-terminal da proteína (resíduos 115-129) está colorido em azul e os resíduos Lys20, Lys115 and Arg118 em destaque na seta representativa. FONTE: dos Santos *et al.*, 2011, com modificações.

Na literatura são descritos três mecanismos de ação destas PLA<sub>2</sub> em células musculares, correlacionando com sua estrutura. O primeiro mecanismo é baseado na seletividade dos efeitos induzidos por PLA<sub>2</sub> explicada pela existência de sítios de ligação específicos encontrados em membranas de células alvos. O segundo mecanismo de ação refere-se à penetração na membrana plasmática, ocasionando desarranjo na integridade da dupla camada lipídica, mediante um mecanismo independente da hidrólise de fosfolípidos. Este efeito é notório em PLA<sub>2</sub>s do grupo II PLA<sub>2</sub>-símile Lys49, no qual a posição deste aminoácido de carga positiva na posição 49 da cadeia polipeptídica afeta a interação com íons cálcio, reduzindo sua atividade catalítica, porém não afeta sua atividade miotóxica. Finalmente, o terceiro modelo de mecanismo de ação das miotoxinas refere-se à interação e ruptura de membrana plasmática por hidrólise dos fosfolípidos que compõem a bicamada lipídica. (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984; KINI e EVANS, 1989; GUTIÉRREZ e OWNBY, 2003).

## 1.6 Inibidores Naturais de PLA<sub>2</sub>s

### 1.6.1 Origem, estrutura e classificação

Sabe-se que existem diversos compostos capazes de neutralizar os efeitos da peçonha e toxinas de serpentes, tais como os anticorpos, agentes químicos, compostos de origem animal e vegetal. Como mostra a Tabela I que apresenta alguns inibidores descritos na literatura.

Algumas plantas possuem ação antiofídica, e dessas já foram isolados componentes bioativos capazes de inibir os principais efeitos tóxicos induzidos por PLA<sub>2</sub>s de peçonhas de serpentes, tais como edema e miotoxicidade. Dentre estes compostos, destacam-se os componentes fenólicos isolados de Guaçatonga (*Casearia sylvestris*) (BORGES *et al.*, 2000), de Erva-baleia (*Cordia verbenácea*) (TICLI *et al.*, 2005), de Galocatequina (*Schizolobium parahyba*) (VALE *et al.*, 2007), dentre outros.

TABELA I: Exemplos de inibidores de PLA<sub>2</sub> purificados em diferentes origens.

Origem	Espécie	Nome do Inibidor	Efeito inibitório miotóxico	Referência
Mamíferos	<i>Didelphis marsupialis</i>	DM64	Miotoxinas <i>B. asper</i>	Rocha <i>et al.</i> (2002)
	<i>Didelphis albiventris</i>	Complexo ABC	Peçonha de <i>Bothrops sp.</i>	Soares <i>et al.</i> (1997)
Serpentes	<i>Bothrops asper</i>	BaMIP PLI $\alpha$	Miotoxinas I-IV de <i>B. asper</i>	Lizano <i>et al.</i> (1997)
	<i>Bothrops moojeni</i>	BmjMIP PLI $\alpha$	PLA <sub>2</sub> de <i>Bothrops</i>	Soares <i>et al.</i> (2003)
	<i>Cerrophidian godmani</i>	CgMIP-I (PLI $\gamma$ )	MT-I C. <i>godmani</i>	Lizano <i>et al.</i> (2000)
		CgMIP-II (PLI $\alpha$ )	MT-II C. <i>godmani</i>	Lizano <i>et al.</i> (2000)
Planta	<i>Withania sonnifera</i>	WSG	NNXIa-PLA <sub>2</sub> <i>Naja naja</i>	Deepa e Gowda (2002)

Fonte: Lizano; Domont; Perales (2003), com modificações.

Em mamíferos os principais exemplos de inibidores já purificados são encontrados em animais de hábito ofiófagos, como algumas espécies de marsupiais: *Didelphis marsupialis aurita* e *Philander opossum*, que demonstraram

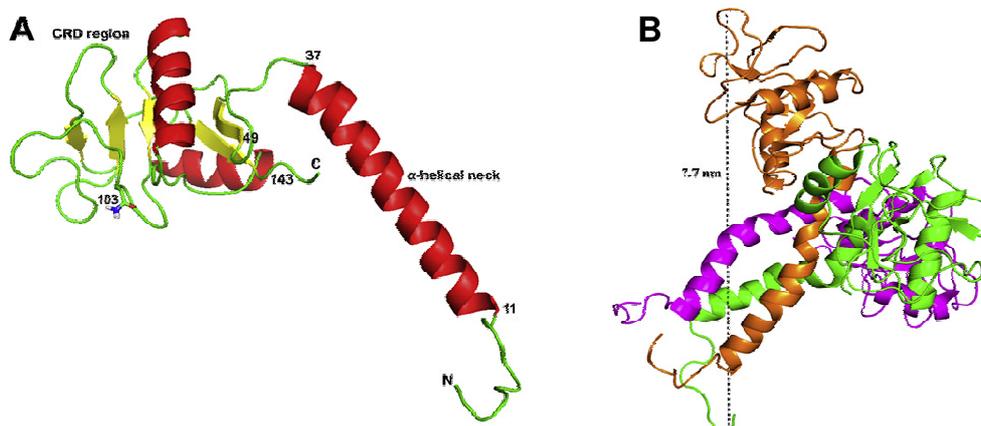
inibição contra os efeitos de necrose muscular (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003).

Os inibidores de PLA<sub>2</sub> não são anticorpos e estão presentes no sangue de diferentes animais, inclusive em mamíferos, antes mesmo de uma possível exposição às toxinas (OVADIA; KOCHVA, 1997; DOMONT *et al.*, 1991; THWIN e GOPALAKRISHNAKONE, 1998). Os inibidores isolados a partir do plasma de serpentes têm sido bastante citados na literatura. O primeiro inibidor de PLA<sub>2</sub> foi purificado a partir do plasma da serpente *Trimeresurus flavoviridis* por Kihara (1976) (KINKAWA *et al.*, 2010, DOMONT, *et al.*, 1991, FAURE, 2000). Acredita-se que a síntese destes inibidores seja estritamente hepática, uma vez que o fígado é o principal produtor de proteínas plasmáticas, e são destinados à corrente sanguínea (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003).

Os inibidores de PLA<sub>2</sub>s podem ser classificados em três tipos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  de acordo com seus aspectos estruturais (INOUE *et al.*, 1991; THWIN *et al.*, 2002). A classe de inibidores  $\alpha$  ( $\alpha$ PLI) é caracterizada por apresentar proteínas globulares constituídas por mais de duas subunidades isoméricas com 20 a 25 kDa e cerca de 147 aminoácidos, com um sítio N-glicosilação conservado (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003). Os  $\alpha$ PLI são glicoproteínas ácidas que possuem similaridade sequencial com o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) das lectinas tipo-C (INOUE *et al.*, 1997), o que provavelmente confere a capacidade de neutralização das fosfolipases A<sub>2</sub>.

Oliveira e colaboradores (2008) isolaram e caracterizaram estrutura e funcionalmente um inibidor tipo  $\alpha$  a partir do plasma da serpente *Bothrops jararacussu*, bem como Santos-Filho e colaboradores (2011) que também purificaram e caracterizaram um inibidor desta mesma classe, porém do plasma de *Bothrops alternatus*. (FIGURA 7). É visto por estes dois autores que mesmo com o mecanismo ainda não totalmente elucidado, é sabido, por estudos de dicroísmo circular, que o complexo formado pelo inibidor e as diferentes PLA<sub>2</sub>, não altera a conformação de nenhuma das proteínas envolvidas. Além disso, Santos-Filho e colaboradores (2011), demonstraram por estudos com inibição de peptídeos sintéticos contendo a região C-terminal de PLA<sub>2</sub>s, que a interação entre o inibidor e proteínas ocorre de várias maneiras e não apenas na região C-terminal. Soares e colaboradores (2003), sugerem pelo menos, dois mecanismos

em que os  $\alpha$ PLIs neutralizam PLA<sub>2</sub>s. O primeiro seria por ligação à PLA<sub>2</sub>s por meio do domínio CRD nos inibidores ou em segundo, agindo diretamente ligando a outros domínios de miotoxinas, evitando o contato direto desta com a membrana.



**Figura 7:** Modelo teórico trimérica do inibidor  $\alpha$ BaltMIP. Em **A** o monômero isolado. Em **B** o arranjo dos três monômeros de  $\alpha$ BaltMIP em formação esférica trimérica. FONTE: Santos-Filho e colaboradores (2011), com modificações.

Os inibidores do tipo  $\beta$  ( $\beta$ PLIs) também são constituídos por subunidades protéicas e apresentam múltiplas repetições de domínios sucessivos ricos em leucina. Eles mostram-se 33% homólogos com a  $\alpha_2$ -glicoproteína humana, também rica em leucina (LRRs) e possuem quatro sítios de N-glicosilação por subunidade protéica (OKUMURA *et al.*, 1998). Apenas dois  $\beta$ PLIs foram identificados em duas espécies de serpentes, *Gloydius brevicaudus*, uma espécie peçonhenta (OHKURA *et al.*, 1997) e *Elaphe quadrivirgata*, uma espécie com hábitos ofiofágicos (OKUMURA *et al.*, 1998; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003). Lima e colaboradores (2011) demonstraram o primeiro caso de inibidor do tipo  $\beta$  encontrado no transcriptoma da glândula de veneno de uma espécie de serpente peçonhenta, porém a funcionalidade da presença deste inibidor na peçonha, bem como sua possível interferência na atividade, não foi bem definida até o momento.

Os inibidores de PLA<sub>2</sub>s do tipo  $\gamma$  ( $\gamma$ PLI) são os que apresentam o maior número de subunidades protéicas, com peso molecular de 90 a 130 kDa, compostos por 3-6 subunidades não covalentes de massa 20-31 kDa. São conhecidos por apresentarem dois conjuntos de repetições intramoleculares de

domínios ricos em cisteína, denominados motivo *Three-fingers* (OHKURA *et al.*, 1999; ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2008). Este domínio apresenta grande semelhança com o receptor da uroquinase ativadora de plasminogênio (u-PAR), sendo o responsável pelo reconhecimento da região de ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  de  $\text{PLA}_2\text{s}$ , fato que garante o alto espectro de inibição em todos os grupos de  $\text{PLA}_2\text{s}$  (IA, IIA e IIIA) (DUNM, 2001).

Os inibidores do tipo  $\gamma$  possuem ainda um sítio de glicosilação bem conservado na posição 157, estes foram descritos no plasma de diferentes espécies de serpentes, como de *Crotalus durissus terrificus* (FORTES-DIAS *et al.*, 1991), *Agkistrodon blomhoffii siniticus*, (OKUMURA *et al.*, 1998) e *Python reticulatus* (THWIN *et al.*, 2002). Alguns autores propõem uma subdivisão desta classe em duas novas subclasses  $\gamma\text{PLI}$  I e II. Esta divisão está baseada em diferenças nas estruturas quaternárias e nos perfis de inibição destes inibidores (FORTES-DIAS *et al.*, 1999, LIZANO *et al.*, 2000; 2003). Sendo que, segundo a nova classificação, a classe  $\gamma\text{PLI}$  I seria caracterizada por inibidores com inibição de  $\text{PLA}_2\text{s}$  das classes I, II e III, com presença de heterodímeros na estrutura quaternária (subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ ), comumente encontrados nas serpentes das famílias Elapidae, Hydrophidae e Colubridae. A classe  $\gamma\text{PLI}$  II é caracterizada por inibirem preferencialmente as  $\text{PLA}_2\text{s}$  da classe II, estruturalmente são constituídos por monômeros, sendo facilmente encontrados nas famílias Crotalidae e Viperidae, dentre outras serpentes do velho mundo (PERALES e DOMONT 2002).

### **1.6.2 Mecanismo de ação dos inibidores de $\text{PLA}_2\text{s}$**

A elucidação dos mecanismos de ação dos inibidores é descrita de acordo com as classes a que pertencem (FAURE, 2000). O mecanismo de ação destes inibidores, frente às fosfolipases  $A_2$ , ainda é pouco esclarecido. Alguns estudos de difração circular demonstraram que não há alteração conformacional dos inibidores (tipo  $\alpha$  e  $\gamma$ ) e de fosfolipases  $A_2$  no complexo inibidor-proteína (OLIVEIRA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Primeiramente, estudos com os inibidores do tipo  $\alpha$  indicam que a região semelhante ao domínio de reconhecimento de carboidrato (CDR), possui relação

direta com o mecanismo de inibição desta classe (OLIVEIRA *et al.*, 2008). É descrito que os inibidores do tipo  $\alpha$  formam um complexo solúvel ligado não covalentemente, sendo este responsável pela a inibição da atividade de PLA<sub>2</sub>. O trabalho de Kihara (1976) foi o primeiro a demonstrar a formação de um complexo proteico entre uma PLA<sub>2</sub> de *Trimeresurus flavoviridis* e um inibidor do tipo  $\alpha$ , obtido a partir do plasma desta mesma serpente. Neste caso estudos indicaram que todas as três subunidades *CRD-like* são necessárias para o reconhecimento de PLA<sub>2</sub> (INOUE *et al.*, 1997).

Similaridades na estrutura primária entre os  $\alpha$ PLIs e receptores de sPLA<sub>2</sub>s de mamíferos poderiam explicar suas funções fisiológicas como antitoxinas solúveis no sangue de serpentes. Foi demonstrado ainda, que o receptor humano destas PLA<sub>2</sub>s secretória também existe em forma solúvel sem os domínios transmembrana. Dessa forma, este receptor pode desempenhar um papel importante na regulação da atividade da PLA<sub>2</sub> secretórias, demonstrando propriedades pró e anti-inflamatórias em mamíferos (LAMBEAU *et al.*, 1999 e DUNM *et al.*, 2001).

Os inibidores tipo  $\alpha$ PLIs são conhecidos por possuir uma maior afinidade por PLA<sub>2</sub> básica do tipo Asp49 (NOEL *et al.*, 1998; FLEMING *et al.*, 1993; KOLBE *et al.*, 1993; TANAKA *et al.*, 1986), o domínio responsável por esta ligação, inibidor e enzima, já é conhecido na literatura. Porém um estudo comparando entre dois tipos de inibidores  $\alpha$  e  $\gamma$ , ambos purificados do plasma de *Bothrops jararacussu*, indicou que o inibidor  $\alpha$  possui maior poder de inibição para PLA<sub>2</sub>s PLA<sub>2</sub>-símile Lys49 quando comparado com o tipo  $\gamma$  (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Outros estudos de ligação com os  $\alpha$ PLIs com a Glutathione S-transferase, indicaram que o fragmento N-terminal com cerca de 37 aminoácidos juntamente com a região reconhecedora de carboidrato (*CRD-like*) e o domínio C-terminal (com 12 aminoácidos hidrofóbicos), estão envolvidos no mecanismo de ligação com PLA<sub>2</sub>. O domínio das sPLA<sub>2</sub>s envolvida na ligação inibidor ainda não foi claramente determinada. Porém, alguns autores sugerem que a ligação de um único resíduo aromático sobre a superfície de sPLA<sub>2</sub>s da molécula, rodeado por dois resíduos ácidos, podem estar envolvidos no mecanismo de reconhecimento deste inibidor (INOUE *et al.*, 1997). Além disso, foi demonstrado por técnica de ressonância de superfície que um mutante, H48Q, de PLA<sub>2</sub>, desprovido de

atividade enzimática, ligou-se ao inibidor com a mesma afinidade que a enzima nativa, sugerindo que o sítio catalítico das sPLA<sub>2</sub> não é diretamente envolvido na ligação do inibidor do tipo  $\alpha$  (LAMBEAU *et al.*, 1995; CHABOT, 1999).

O mecanismo de interação dos inibidores do tipo  $\beta$  ainda não foi totalmente elucidado, uma vez que este tipo de inibidor é pouco identificado no soro das serpentes. Porém, estudos apontam que há uma interação direta do  $\beta$ PLI com uma PLA<sub>2</sub> básica de *A. blomhoffii*, realizando testes por filtração em gel, (OKUMURA *et al.*, 1998). Estes testes demonstraram que a razão molar de PLA<sub>2</sub>/PLI foi determinada como 3, indicando que cada subunidade deste tipo de inibidor pode ligar-se uma molécula de PLA<sub>2</sub> básica independentemente.

Os  $\beta$ PLIs possuem característica de inibir preferencialmente PLA<sub>2</sub>s básicas de sua própria peçonha. Além disso, inibidores desta classe apresentam reconhecimento por proteínas do Citocromo c como descrito por Shirai e colaboradores (2010), que justificaria a presença destes inibidores no plasma de serpentes não peçonhentas.

Para os inibidores do tipo  $\gamma$ , o mecanismo de inibição foi primeiramente sugerido com estudos conduzidos para o efeito protetor contra a ação neurotóxica de neurotoxinas da peçonha. Estes inibidores formam um complexo não covalente toxina-inibidor, como demonstraram Ovadia e colaboradores (1997). O estudo relatou ainda que um fator anti-neurotóxico isolado o soro de *Vipera palestinae* forma um complexo, inibidor+enzima com um componente ácido da peçonha que participa sinergicamente na ação neurotóxica da mesma.

O mecanismo de neutralização do efeito tóxico de neurotoxinas proporcionado por um inibidor do tipo  $\gamma$  foi descrito por estudos com a crotoxina e o inibidor de *Crotalus durissus terrificus* (CNF) (PERALES *et al.*, 1995). Estudos realizados com um inibidor desta classe, isolado a partir de soro de *Crotalus durissus terrificus* denominado como CICS (estruturalmente formado por seis ligações não covalentes associadas com subunidades de 23 e 25 kDa) demonstraram a capacidade do mesmo em suprimir a atividade da crotoxina e sua toxicidade *in vivo* (FORTES-DIAS *et al.*, 1991; FORTES-DIAS *et al.*, 1994; PERALES *et al.*, 1995).

A incubação do CICS com a crotoxina levou à formação de um complexo, comprovado por *SDS-PAGE* e posteriormente por ressonância plasmônica de

superfície (SPR) (FAURE *et al.*, 2000). A composição do complexo CICS-crotoxina foi analisada por *Western blotting* em condições não desnaturantes utilizando anticorpo policlonal específico. Dessa forma, os anticorpos foram dirigidos às subunidades CA e CB da crotoxina (PERALES *et al.*, 1995). Os resultados demonstraram que o anticorpo Anti-CB reconheceu CB no complexo, porém o anti-CA não reagiu com o complexo. Com isso, o autor afirma que o complexo formado após incubação com a crotoxina apresentou a subunidade CB ligado obrigatoriamente ao inibidor CICS, porém não ligado à subunidade CA. (FAURE *et al.*, 2000). Portanto a interação do CICS-CACB aparentemente está envolvida na dissociação das subunidades da crotoxina, bem como à formação de um complexo estável e não tóxico conhecido como CICS-CB, no qual a subunidade tóxica CA do complexo CACB é substituído pelo CICS, confirmando assim sua capacidade inibitória.

Por fim, a confirmação do mecanismo de inibição da classe  $\gamma$  de inibidores conta com algumas informações estruturais sobre o domínio da interação com as sPLA<sub>2</sub>s. Um estudo de ligação de um  $\gamma$ PLI de *Trimeresurus flavoviridis* indicou que apenas um de dois motivos *three-finger* é capaz de se ligar a PLA<sub>2</sub>s e neutralizá-la (NOBUHISA, 1998).

### **1.6.3 Processo de regulação endógena dos inibidores e filogenia presente no grupo $\gamma$**

Estudos de regulação da expressão de inibidores  $\alpha$ PLI,  $\beta$ PLI e  $\gamma$ PLI foram conduzidos administrando diferentes tipos de PLA<sub>2</sub>s nas próprias serpentes, via intramuscular. Observou-se, dessa forma, um aumento significativo da expressão destes inibidores e sua presença no soro destes animais. Tal resultado sugere que, alguns fatores que induzem a regulação da expressão dos PLIs no fígado das serpentes estão contidos na constituição protéica de sua peçonha. Visto que, as PLA<sub>2</sub>s ácidas, induziram a expressão de  $\alpha$ PLI e  $\beta$ PLI em um intervalo de tempo de 4 a 12 horas, porém a acidificação da peçonha inativou a expressão de  $\gamma$ PLI no fígado. Estes resultados indicam que a expressão dos inibidores no fígado é regulada de maneira independente no organismo destes animais (KINKAWA *et al.*, 2010). Dessa forma, a constituição da peçonha está

diretamente ligada à produção endógena de inibidores, garantindo assim, a diversidade encontrada destas proteínas.

Os avanços nos estudos de inter-relação com os inibidores da mesma classe foram traçados com a classe  $\gamma$ , a partir de clones de cDNA dos inibidores desta classe. Verificou-se a presença de uma estrutura de oligopeptídeos com ao menos 19 resíduos de aminoácido conservados na sequência, encontrados em todos os inibidores correlacionados, indicando uma alta similaridade entre eles. Esta alta similaridade da estrutura primária entre os inibidores do tipo  $\gamma$ , leva a considerar também a uma alta similaridade ao padrão da estrutura secundária, com folhas- $\beta$  e alfa-hélice. Além disso, foi encontrada uma região de alfa-hélice na posição carboxi-terminal (157-164 resíduos) comum a todos. Especialmente nas serpentes do novo mundo foram encontradas regiões comuns para sítios de fosforilação, bem como determinação de sítios de *N*-glicosilação (ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2008).

Dessa forma foi possível traçar a filogenia dos inibidores desta classe, relacionando-os de acordo com a prospecção e estrutura dos  $\gamma$ PLIs analisados. Como mostra a figura 8, pode-se observar o grau de similaridade entre as diferentes espécies, em diferentes gêneros de acordo com a estrutura, reforçando a ideia de similaridade entre espécies próximas no parentesco, bem como com inibidores a que pertencem.

Além disso, este estudo trouxe a descoberta de um motivo consensual entre os  $\gamma$ PLIs, composto por aproximadamente 15 resíduos de aminoácidos (<sup>104</sup>QFPFGLPLSRPNGYY<sup>118</sup>). Esta sequência é similar ao decapeptídeo P-PBIII sintetizado por Thwin e colaboradores (2002), com base em um segmento da estrutura primária do  $\gamma$ PLI de *P. reticulatus* (PIP). De acordo com estes autores, a P-PBIII reconhece e inibe a atividade enzimática *in vitro* da PLA<sub>2</sub> dos grupos I-III, dentre outras PLA<sub>2</sub>s humana, além de notáveis efeitos antiinflamatórios *in vivo*. Em conclusão, o estudo demonstrou que os  $\gamma$ PLI encontrados em serpentes brasileiras, possuem este motivo capaz de proporcionar efeitos de inibição contra ação direta de PLA<sub>2</sub>s, bem como de efeitos antiinflamatórios. Além disso, do ponto de vista terapêutico, possibilitou ainda um desenvolvimento de um forte modelo para o desenvolvimento de novas drogas contra ação de PLA<sub>2</sub> com este oligopeptídeo (ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2008).

#### 1.6.4 Potencial terapêutico dos PLIs

Visando buscar alternativas no tratamento de acidentes ofídicos, bem como novos modelos de fármacos como forma terapêutica contra doenças inflamatórias, são necessários investimentos em novas pesquisas, para descoberta de novos inibidores de PLA<sub>2</sub>s e compreensão do seu mecanismo de inibição. Visto que estas glicoproteínas possuem um alto grau de reconhecimento e inibição da ação de PLA<sub>2</sub>s (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003).

Na terapêutica para antiveneno existem algumas limitações para o uso de inibidores de PLA<sub>2</sub>s, tendo em vista que os efeitos tóxicos do envenenamento são decorrentes do efeito sinérgico de diferentes tipos de toxinas que compõe a peçonha. Dessa forma seria necessária a formulação de uma mistura com diferentes inibidores para conseguir um produto que neutralizasse a toxicidade global do envenenamento. Isto levaria a outra limitação, a disponibilidade de inibidores, pois a principal fonte de obtenção é considerada insuficiente e ecologicamente inviável para fins de comercialização. Para isso as pesquisas caminham para o desenvolvimento da produção heteróloga destes inibidores (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003).

Outra consideração importante a ser ressaltada no desenvolvimento de inibidores endógenos na terapêutica seria a sua toxicidade e seu potencial imunogênico. Diversas proteínas de alta massa molecular podem induzir resposta imune, assim, os PLIs poderiam levar a uma reação anafilática indesejada (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003). Dessa forma, os estudos com desenvolvimento do motivo consensual entre os  $\gamma$ PLIs, composto por aproximadamente 15 resíduos de aminoácidos (<sup>104</sup>QPFPGGLPLSRPNGYY<sup>118</sup>) (ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2008), reduziria esta complicação, uma vez que seu tamanho menor minimizaria estas reações adversas. Outro benefício do desenvolvimento destes motivos seria a facilidade em serem produzidos em escala industrial, por não terem a complexidade de uma proteína nativa.

A importância dos inibidores, principalmente na terapêutica de doenças pró inflamatórias é favorecido por atuar na inibição de PLA<sub>2</sub>s que produzem como produto de suas reações fatores pró-inflamatórios, como os eicosanóides, mediadores da via da Cicloxigenase 2 (COX2). Dessa forma, a utilização de

inibidores de PLA<sub>2</sub>s, como estratégia terapêutica no tratamento de inflamações e danos teciduais, é de grande importância, uma vez que proporciona o controle da atividade da PLA<sub>2</sub>s facilitando o tratamento dos estados patológicos relacionados a processos inflamatórios (YEDGAR *et al.*, 2000). Para isto é necessário o desenvolvimento de pesquisas que visam a elucidação dessas estruturas, bem como suas conformações e mecanismo de ação, incluindo a estrutura tridimensional e de seus complexos com as diferentes PLA<sub>2</sub>s. Com isso, os inibidores de PLA<sub>2</sub>s são grandes modelos para alvo na formulação de fármacos com importância em diversos processos inflamatórios.

## Referências

- ALVARADO, J.; GUTIÉRREZ, J. M., Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> isolates from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae). **Ver. Biol. Trop.**, v. 36, p. 563-565, 1988.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A<sub>2</sub> – A structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827 – 841, 1996.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente crotálico. CARDOSO, J. L. C.; FRANCA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, V., editors. Animais Peçonhentos no Brasil. Biología, Clínica e Terapeutica dos Acidentes, **2nd edition Sao Paulo: Sarvier**, p. 108–15, 2009.
- BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. 2012. Répteis brasileiros: Lista de espécies. Versão 2012.2. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Acessada em 01/02/2013.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. de Saúde Públ.**, v.19, n.1, p.7-16, 2003.
- BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, R. S.; FONSECA, F. P.; MENALDO, D. L.; FERREIRA, F. B.; HENRIQUE-SILVA, F., et al. Crotalus durissus collilineatus venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile. **Biochimie**, v. 91, p. 586–95, 2009.
- BOLDRINI-FRANÇA, J.; CORRÊA-NETTO, C.; SILVA, M. M. S.; RODRIGUES, R. S.; LA TORRE, P.; PÉREZE, A.; SOARES, A. M.; ZINGALI, R. B.; NOGUEIRA, R. A.; RODRIGUES, V. M.; SANZE, L.; CALVETE, J. J. Snake venomomics and antivenomics of Crotalus durissus subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 1758 – 1776, 2010.
- BON, C.; BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M. S.; LAMBEZAT, M. P. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin. **Act. Physiol. Pharmacol. Lat.**, v. 39, p. 439–48, 1989.
- BON, C. Multicomponent neurotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. In: KINI, R. M., editor. Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: structure, function and mechanism. **Chichester: Wiley**, p. 269–85, 1997.
- BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on snake and bee venoms and on activity of phospholipase A<sub>2</sub>. **Comp. Biochem. Physiol. B Bioche. Mol. Biol.**, v. 127, p. 21-30, 2000.

BRASIL, Ministério da Saúde – **Acidentes por animais peçonhentos - Serpentes**. Disponível em:<[HTTP://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/Area.cfm?id\\_area=1539](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/Area.cfm?id_area=1539). Acessado em: 05 abril, 2013.

BRATTSTROM, B. H. Evolution of the pitvipers. **Transactions of the San Diego Society of Natural History**, v. 13, p. 185–268, 1964.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A<sub>2</sub> Biochemistry. **Cardiovasc. Drugs Ther**, v. 23, p. 49-59, 2009.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; CID, P.; DE LA TORRE, P.; FLORES-DIAZ, M.; DOS SANTOS, M. C.; BORGES, A.; BREMO, A. ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; ALAPE-GIRON, A.; GUTIERREZ, J. M. Snake venomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. **Journal of proteome research**, v. 9, p. 528–44, 2010.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of Latin America. **Comstock Publishing Associates**, 1989.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of the Western Hemisphere. Ithaca (NY) and London. **Comstock Publishing Associates**, 2004.

CARDOSO, J. L. C. Animais peçonhentos no Brasil: Biologia clínica e terapêutica dos acidentes. **São Paulo: Sarvier**, 2003.

CASTOE, T. A.; DAZA, J. M.; SMITH, E. N.; SASA, M.; KUCH, U.; CAMPBELL, J. A. Comparative phylogeography of pitvipers suggests a consensus of ancient Middle American highland biogeography. **J. Biogeographic**, v. 36, p. 88–103, 2009.

CHABOT, S. Etude des interactions de la protéine A du surfactant avec la phospholipase A<sub>2</sub> de type II, **DEA de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire**, Université Paris VI, 1999.

CHANG, C. C.; TSENG, H. Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. **Brazil J. Pharmacol.**, v. 63, p. 551–9, 1978.

CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H.; RULLER, R.; SA, J. M.; WARD, R. J. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a PLA<sub>2</sub> Lys49-phospholipase A<sub>2</sub>. **Biochemical Journal**, v. 366, p. 971-976, 2002.

CUMMINGS, B. S. Phospholipase A<sub>2</sub> as target for anti-cancer drugs. **Biochem. Pharmacol.**, v. 74, p. 949-959, 2007.

DALMORA, S. L.; VACCARI, S. F.; SAMPEDRO, A. M.; PEREIRA, J. E. S. Dosagem biológica do antiveneno Botrópico. **Memórias Instituto Butantan**, v. 54, p. 21-30, 1992.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A<sub>2</sub>. **J. Biol. Hem.**, v. 269, p. 13057-13060, 1994.

DENNIS, E. A. History, classification, structure and function of phospholipase A<sub>2</sub>. in UHL, W.; NEVALAINEN, T. J.; BÜCHLER, M. W. (eds): Phospholipase A<sub>2</sub>. Basic and Clinical Aspects in Inflammatory Diseases. **Prog Surg. Basel, Karger**, v. 24, p 1-7, 1997.

DOMONT, G. B.; PERALES, J.; MOUSSATCHE, H. Natural anti-*snake* venom proteins. **Toxicon**, v. 29(10), p. 1183-94, 1991.

dos SANTOS, J. I.; CARDOSO, F. F.; SOARES, A. M.; dal PAI SILVA, M.; GALLACCI, M.; FONTES, M. R. M. Structural and functional studies of a Bothropic myotoxin complexed to Rosmarinic Acid: new insights into Lys49-PLA<sub>2</sub> inhibition. **PLoS ONE** v. 6, (12): e28521, 2011.

DUNN, K. W. B. Snake inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Biochem. Biophys. Acta**. v. 1533, p. 29-37, 2001.

ESTEVIÃO-COSTA, M. I.; ROCHA, B. C.; MUDADO, M. A.; REDONDO, R.; FRANCO, G. R.; FORTES-DIAS, C. Prospection structural analysis and phylogenetic relationships of endogenous gamma-phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors in Brazilian *Bothrops* snakes (*Viperidae, Crotalinae*). **Toxicon**, v. 58, p. 122-9, 2008.

FAURE G., BON C. Crotoxin, a phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: Purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. **Biochemistry**, v. 27, p. 730–738, 1988.

FAURE G.; GUILLAUME J.L.; CAMOIN L.; SALIOU B.; BON C., Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus*: venom, results from post-translational modifications. **Biochemistry**, v. 30, p. 8074–8083, 1991.

FAURE G.; VILLELA C.; PERALES J.; BON C. Interaction of the neurotoxic and non-toxic secretory phospholipases A<sub>2</sub> with the crotoxin inhibitor from *Crotalus* serum. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 4799–4808, 2000.

FAURE, G. Natural inhibitors of toxic phospholipase A<sub>2</sub>. **Biochimie**, v. 82, p. 833-840, 2000.

FERNARD, D.; LAMBEAU, G.; VALENTIN, E.; LEFEBVRE, J. C.; LAZDUNSKI, M.; DOGLIO, A. Secreted phospholipase A<sub>2</sub> a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. **J. Clin. Invest.**, v. 104, p. 611-618, 1999.

FLEMING T.J.; O' HUGIN C.; MALEK T.R. Characterization of two novel Ly-6 genes: protein sequence and potential structural similarity to  $\alpha$ -bungarotoxin and other neurotoxin. **J. Immunol.**, v. 150, p. 5379–5390, 1993.

FORTES-DIAS, C. L.; FONSECA, B. C. B.; KOCHVA, E.; DINIZ, C. R., Purification and properties of an antivenom factor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v. 29, p. 99-1008, 1991.

FORTES-DIAS C.L.; LIN Y.; EWELL J.; DINIZ C.R.; LIOU T.Y. A phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 15646–15651, 1994.

FORTES-DIAS, C. L.; JANNOTTI, M. L. D.; FRANCO, F. J. L.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R. Studies on the specificity of CNF, a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor isolated from the blood plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Interaction with PLA<sub>2</sub> from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**. v. 37, p. 1747-1759, 1999.

FRAENKEL-CONRAT H.; JENG T.W.; HSIANG M.; in: EAKER D.; WADSTRÖM T. (Eds.), Natural toxins. **Pergamon**, Oxford, pp. 561–567, 1980.

FRY, B.G.; VIDAL, N.; NORMAN, J.A.; VONK, F.J.; SCHEIB, H.; RAMJAN, R.; KURUPPU, S.; FUNG, K.; HEDGES, S.B.; RICHARDSON, M.K.; HODGSON, W.C.; IGNJATOVIC, V.; SUMMERHAYES, R.; KOCHVA, E. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, v. 439, p. 584–588, 2006.

FRY, B. G.; SCHEIB, H.; VAN DER WEERD, L.; YOUNG, B.; MCNAUGHTAN, J.; RAMJAN, S. F.; VIDAL, N.; PELMANN, R. E.; NORMAN, J. A. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (*Caenophipia*). **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, p. 215-246, 2008.

FULY, A. L.; MACHADO, O. L.; ALVES, E. W.; CARLINI, C. R. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Lachesis muta* (Bushmasher) snake venom. **Thromb. Haemost.**, v. 78, p. 1372-1380, 1997.

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<sub>2</sub> BaSpII RP4 of the *Bothrops alternates* snake venom from Argentina. **Toxicon**, v. 56 (1), p. 64-74, 2010.

GLOYD, H. K. The rattlesnakes, Genera *Sistrurus* and *Crotalus*: A study in zoogeography and evolution. **Chicago: Chicago Academy of Sciences**, p. 1–270. Special Publication, 1940.

- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon**, v. 22, p. 115-128, 1984.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from Bothrops snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405–1424, 1995.
- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, p. 915-931, 2003.
- HENDON R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological role of the two components of crotoxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 68, p. 1560–1563, 1971.
- HOSER, R. T. A reclassification of the rattlesnakes; species formerly exclusively referred to the genera *Crotalus* and *Sistrurus*. **Aust. J. Herpetol.**, v. 6, p.1–21, 2009.
- INOUE, S.; KOGAKI, H.; IKEDA, K.; SAMEJIMA, Y.; OMORI-SATOH, T. Amino acid sequences of the two subunits of a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. Sequence homologies with pulmonary surfactant apoprotein and animal lectins. **Biol. Chem.**, v. 266, p. 1001-1007, 1991.
- INOUE, S.; SHIMADA, A.; OUKURA, N.; IKEDA, K.; SAMEJIMA, Y.; OMORISATOH, T.; HAYASHI, K. Specificity of two types of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from plasma of venomous snakes. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 41, p. 529-537, 1997.
- JANDROT-PERRUSA, M.; LAGRUE, A. H.; LEDUC, M.; OKUMA, M.; BOM, C. Convulxin-induced platelet adhesion and aggregation: involvement of glycoproteins VI and lalla. **Platelets**, v. 9, p. 207-211, 1998.
- KETELHUT, D. F. J.; HOMEM DE MELLO, 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 A<sub>2</sub> isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochim.**, v. 85, p. 983-991, 2003.
- KIHARA, H. Studies on phospholipase A<sub>2</sub> in *Trimeresurus flavoviridis* venom. III. Purification and some properties of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor in Habu serum. **J. Biochem.**, v. 80, p. 341–349, 1976.
- KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v. 27, p. 613-635, 1989.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.

KINKAWA, K.; SHIRAI, R.; WATANABE, S.; TORIBA, M.; HAYASHI, K.; IKEDA, K.; INOUE, S. Up-regulation of the expressions of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors in the liver of a venomous snake by its own venom phospholipase A<sub>2</sub>. **Biochem. and Biophys. Res. Communication**, v. 395, p. 377-381, 2010.

KLAUBER, L. M. Classification, distribution and biology of the venomous snakes of northern Mexico, the United States and Canada. In: Bücherl W, Buckley EE, editors. *Crotalus and Sistrurus. Venomous animals and their venoms.* **Venomous vertebrates New York & London: Academic**, v. 2, p. 115–56, 1971.

KLAUBER, L. M. Rattlesnakes: their habitats, life histories and influence on mankind. Second edition. **Berkeley: University of California Press**; 1997.

KNIGHT, A.; STYLER, D.; PELIKAN, S.; CAMPBELL, J. A.; DENSMORE, L. D.; MINDRELL, D. P. Choosing among hypotheses of rattlesnake phylogeny: a best-fit rate test for DNA sequence data. **Syst Biol**, v. 42, p. 356–67, 1993.

KOLBE, H. V.; HUBER, A.; CORDIER, P.; RASMUSSEN, U. B.; BOUCHON, B.; JAQUINOD, M.; VLASAK, R.; DELOT, E. C.; KREIL, G. Xenoxins, a family of peptides from dorsal gland secretion of *Xenopus laevis* related to snake venom cytotoxins and neurotoxins. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 16458–16464, 1993.

KRIZAJ, I.; BIEBER, A. L.; RITONJA, A.; GUBENSEK, F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Vipera ammodytes* venom. **European Journal of Biochemistry**, v. 202, p. 1165-1168, 1991.

KRIZAJ, I.; FAURE, G.; GUBENSEK, F.; BON, C. Neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> ammodytoxin and crotoxin bind to distinct high-affinity protein acceptors in *Torpedo marmorata* electric organ. **Biochemistry**, v. 36, p. 2779–2787, 1997.

LAMBEAU, G.; ANCIAN, P.; NICOLAS, J. P.; BEIBOER, S. H.; MOINIER, D.; VERHEIJ, H.; LAZDUNSKI, M. Structural elements of secretory phospholipases A<sub>2</sub> involved in the binding to M-type receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 5534–5540, 1995.

LAMBEAU, G. Receptors for a growing family of secreted phospholipase A<sub>2</sub>, Trends. **Pharmacol. Sci.**, v. 20, p. 162-169 1999.

LIMA, R. M.; ESTEVÃO-COSTA, M. I.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P.L.; DINIZ, M. R. V.; FORTES-DIAS, C. L. Phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors (bPLIs) are encoded in the venom glands of *Lachesis muta* (Crotalinae, Viperidae) snakes. **Toxicon**, v. 57, p. 172-175, 2011.

LIZANO, S.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; FOX, J. W.; LAMBEAUS, G.; LAZDUNSKI, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Two phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from the plasma of *Cerrophidion (Bothrops) godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. **Biochem. J.**, v. 346, p. 631-639, 2000.

LIZANO, S.; DUMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, p. 963-977, 2003.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARIA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venoms. **Toxicon**, v. 42, p. 307-312, 2003.

LORET, S.; MORENO, J. J. The edema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A<sub>2</sub> purified from porcine pancreas and snake venoms, **Toxicon**, v. 31, p. 949-956, 1993.

MACKESSY, S. P.; WILLIAMS, K.; ASHTON, K. G. Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: a case of venom paedomorphosis. **Copeia**, p. 769-782, 2003.

MAGRO, A.J., SOARES, A.M., GIGLIO, J.R., FONTES, M.R.M. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A<sub>2</sub>: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 311, p. 713-720, 2003.

MUKHERJEE, A. B.; MIELE, L.; PATTABIRAMAN, N. Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes regulation and physiological role. **Biochem. Pharmacol.**, v.48, p. 1-10, 1994.

NOBUHISA I.; CHIWATA T.; FUKUMAKI Y.; HATTORI S.; SHIMOHIGASHI Y.; OHNO M. Structural elements of *Trimeresurus flavoviridis* serum inhibitors for recognition of its venom phospholipase A<sub>2</sub> isozymes. **FEBS Lett.**, v. 429, p. 385-389, 1998.

NOEL L.S.; CHAMPION B.R.; HOLLEY C.L.; SIMMONS C.J.; MORRIS D.C.; PAYNE J.A.; LEAN J.M.; CHAMBERS T.J.; ZAMAN G.; LANYON L.E.; SUVA L.J.; MILLER L.R. RoBo-1, a novel member of the urokinase plasminogen activator receptor/CD59/Ly-6/snake toxin family selectively expressed in rat bone and growth plate cartilage. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 3878-3883, 1998.

OGUIURA, N.; BONI-MITAK, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 46(18), p. 363-70, 2005.

OHKURA, N.; OKUHARA, H.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. P., Characterization of three distinct types of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from the blood plasma of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticis*. **J. Biochem.**, v. 121, p. 527-531, 1997.

OHKURA, N.; KITAHARA, Y.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Isolation and amino acid sequence of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the blood plasma of the sea krait, *Laticauda semifasciata*. **J. Biochem.**, v. 125, p. 375-382, 1999.

OKUMURA K.; OHKURA N.; INOUE S.; IKEDA K.; HAYASHI K. A novel phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor with leucine-rich repeats from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. Sequence homologies with human leucine-rich  $\alpha$ 2-glycoprotein, **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 19469–19475, 1998.

OLIVEIRA, T. C. **Mudanças conformacionais envolvidas na ativação interfacial de Fosfolipases A<sub>2</sub> – uma análise computacional**. Dissertação de mestrado elaborada no Laboratório de Bioquímica Farmacológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

OLIVEIRA, C. Z.; MENALDO, D. L.; MARCUSSI, S.; SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M. An  $\alpha$ -type phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: Structural and functional characterization. **Biochimie**, v. 90, p. 1506 a 1514, 2008.

OLIVEIRA, C. Z.; SANTOS-FILHO, N. A.; MENALDO, D. L.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; GIGLIO, J. R.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; RODRIGUES, F. H. S.; TASIC, L.; DA SILVA, S. L.; SOARES, A. M. Structural and Functional Characterization of a  $\gamma$ -Type Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitor from *Bothrops jararacussu* Snake Plasma. **Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2509-2519, 2011.

OVADIA, M.; KOCHVA E. Neutralization of *Viperidae* and *Elapidae* snake venoms by sera of different animals, **J. Biochem.**, v. 15, p. 541–545, 1997.

OWNBY, C. L. Structure, function and biophysical aspects of aspects of myotoxins from snake venoms, **J. Toxicol.-Toxicon Reviews**, v. 17, p. 213-238, 1998.

OWNBY, C. L., SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S., WHITE, S. P., FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins. **Toxicon**, v. 37, p. 411-445, 1999.

PÁRAMO, L., LOMONTE, B., PIZARRO-CERDÁ, J., BENGOCHEA, J. A., GORVEL, J. P., MORENO, E. Bactericidal activity of Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops asper* snake venom. **Eur. J. Biochem.**, v. 235, p. 452-461, 1998.

PERALES J.; VILLELA C.; DOMONT G.B.; CHOUMET V.; SALIOU B.; MOUSSATCHÉ H.; BON C.; FAURE G. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. **Eur. J. Biochem.**, v. 227, p. 19–26, 1995.

PERALES, J.; DOMONT, G. B. Are inhibitors of metalloproteinases, phospholipases A<sub>2</sub> and myotoxins members of the innate immune system. In: A. Ménez, Editor, **Perspectives in Molecular Toxicology**, Wiley, Chichester, pp.435-456, 2002.

PLACE, A. J.; ABRAMSON, C. I. A quantitative analysis of the ancestral area of rattlesnakes. **J. Herpetol.**, v. 38, p. 152–6, 2004.

POLGAR, J.; MAGNENAT, E. M.; PEITSCH, M. C.; WELLS, T. N.; CLEMETESON, K. J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M(r) phospholipases A<sub>2</sub>: purification, characterization and computer modeling of an anzymically active Ser-49 phospholipase A<sub>2</sub>, ecarpholin S. from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Journal of Biochemistry**, v. 319, p. 961-968, 1996.

QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; FERGUSON, J. E.; POOK, C. E.; SALOMÃO, M. G.; THORPE, R. S.; WÜSTER, W. Phylogeographic patterns of trans-Amazonian vicariants and Amazonian biogeography: the Neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus* complex) as an example. **J. Biogeogr.**, v. 34, p. 1296–312, 2007.

RAMOS, O. H.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Snake venom metalloproteases-structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v. 142, p. 328-346, 2006.

RÜBSAMEN K.; BREITHAUPT H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 270, p. 274–288, 1971.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; KERKIS, I. Crotoxin, a small basic polypeptide myotoxin from rattlesnake venom with cell-penetrating properties. **Curr. Pharm.**, v. 17(38), p. 4351-61, 2011.

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

SANTOS-FILHO, N. A.; FERNANDES, C. A. H.; MENALDO, D. L.; MAGRO, A. J.; FORTES-DIAS, C. L.; ESTEVÃO-COSTA, M. I.; FONTES, M. R. M.; SANTOS, C. R.; MURAKAMI, M. T.; SOARES, A. M. Molecular cloning and biochemical characterization of a myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake plasma. **Biochimie**, v. 93, p. 583-592, 2011.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. **Biochim. et Biophys. Acta**, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>. **Science**, v. 250, p. 1541-1546, 1990.

SHIRAI, R.; GOTOU, R.; HIRANO, F.; IKEDA, K.; INOUE, S. Autologous extracellular cytochrome c is an endogenous ligand for leucine-rich a<sub>2</sub>-glycoprotein and b-type phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor. **J. Biol. Chem.**, v. 285, p. 21607-21614, 2010.

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

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; TOYAMA, M. H.; LOMBARDI, F. R.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical, characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v. 36, p. 503-514, 1998.

SOARES, A. M.; MARCUSSI, S.; STÁBELI, R. G.; FRANÇA, S. C.; GIGLIO, J. R.; WARD, R. J.; ARANTES, E. C. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. **BBRC.**, v. 302, p. 193-200, 2003.

TANAKA S.; MOHRI N.; KIHARA H.; OHNO M. Amino acid sequence of *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A<sub>2</sub>. **J. Biochem.** (Tokyo), v. 99, p. 281–289, 1986.

THWIN, M. M.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: a mini review of the recent developments. **Toxicon**, v. 36(11), p. 1471-1482, 1998.

THWIN, M. M.; SATISH, R. L.; CHAN, S. T. F.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Functional site of endogenous phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from python serum. Phospholipase A<sub>2</sub> binding and anti-inflammatory activity. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, p. 719-727, 2002.

TICLI, F. K.; HAGE, L. I. S.; CAMBRAIA, R. S.; PEREIRA, P. S.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. M.; STÁBILE, R. G.; GIGLIO, J. R.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v. 46, p. 318-27, 2005.

TSAI, I. H.; WANG, U. M.; CHEN, Y. H.; TSAI, T. S.; TU, M. C. Venom phospholipase A<sub>2</sub> of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. **J. of Biochemistry**, v. 377, p. 215-223, 2004.

VALE, L. H. F. do. **Neutralização de atividades biológicas das peçonhas de serpentes botrópicas pelo extrato aquoso e compostos isolados de *Schizolobium parahyba* (FABACEAE)**. 2007. 71 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

VERHEIJ, H. M., VOLWERK, J. J., JANSEN, E. H. J. M., PUYG, W. C., DIJKSTRA, B. W., DRENTH, J., DE HAAS, G. H. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> role of histidina and calcium íon in catalytic mechanism, **Biochem.**, v. 19, p. 743-750, 1980.

VITAL-BRAZIL, O. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking Action. **Mem. Inst. Butantan** v. 33, p. 981–92, 1966.

WARD, R. J.; OLIVEIRA, A. H.; BORTOLETO, R. K.; ROSA, J. C.; FACA, V. M.; GREENE, L. J. Refolding and purification of Bothropstoxin-I a Lys- 49 phospholipase A<sub>2</sub> Homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichi coli*, **Prto. Expr. Purif.**, v. 21, p. 134-140, 2001.

WARD, R. J.; CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H.; RULLER, R.; AS, J. M. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub>: biological and membrane-disrupting activities in the absece of catalysis. **Biochem. J.**, v. 362, p. 89-69, 2002.

WARRELL, D.A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinicalmanagement. *In*: CAMPBELL, J.A., MAR,W.W. (Eds.), *Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. **Comstock Publishing ssociates/Cornell University Press**, Ithaca, NY, v. 7, pp. 709–761, 2004.

WEI, J. F.; WEI, X. L.; CHEN, Q. Y.; HUANG, T.; QIAO, L. Y. WANG, W. Y.; XIONG, Y. L.; HE, S. H. N49 phospholipase A<sub>2</sub>, a unique subgroup of snake venom group II phospholipase A<sub>2</sub>. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1760, p. 462-471, 2006.

WÜSTER W.; FERGUSON, J. E.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; POOK, C. E.; SALOMÃO, M. G.; THORPE, R. S. Tracing an invasion: landbridges, refugia and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: Crotalus durissus). **Mol. Ecol.**, v. 14, p. 1095–108, 2005.

YEDGAR, S.; LICHTENBERG, D.; SCHNITZER, E. Inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> as a therapeutic target **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, 2000.

YUAN, Y.; JACKSON, S. P.; MITCHELL, C. A.; SALEM, H. H. Purification and characterization of a snake venom phospholipase A<sub>2</sub>: A potent inhibitor of agregation platelet. **Thromb. Res.**, v. 70, p. 471-481, 1993.

## Capítulo 2

### **Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de Fosfolipases A<sub>2</sub> do tipo $\gamma$ isolado do soro de *Crotalus durissus collilineatus***

**Resumo:** Alguns animais apresentam uma resistência natural aos efeitos tóxicos induzidos por peçonha de serpentes, isto se deve a presença de inibidores naturais endógenos em seu plasma. Dentre estes, destacam-se os inibidores de fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), os quais são capazes de inibir as atividades enzimáticas e farmacológicas de várias PLA<sub>2</sub>s de peçonhas ofídicas. No presente trabalho, foi demonstrado o isolamento, a caracterização bioquímica e estrutural de um inibidor de PLA<sub>2</sub>, o qual foi isolado do soro da serpente *Crotalus durissus collilineatus* (*Cdc*) por dois passos cromatográficos. Inicialmente o soro de *Cdc* foi aplicado em uma coluna de troca-iônica Q-Sepharos, produzindo seis picos de absorbância a A<sub>280nm</sub> denominados (Q1 a Q6). Posteriormente, a fração Q4, que demonstrou melhores resultados de inibição foi submetida a uma cromatografia de afinidade NHS–Hitrap imobilizada com uma PLA<sub>2</sub>-símile (BnSP-7). Deste fracionamento resultaram duas frações denominadas de NHS-1 e NHS-2, sendo que a fração NHS-2 representa o inibidor de PLA<sub>2</sub> denominado  $\gamma$ CdcPLI. A massa molecular do inibidor determinada por (MALDI-TOF) foi de 22.34 kDa e a sequência primária parcial determinada por Edman e *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) em MS (MALDI-TOF\TOF) mostrando similaridade com outros inibidores do tipo  $\gamma$ . As análises da estrutura secundária realizada por dicróismo circular revelaram aproximadamente 22% de alfa hélices e 29% de folhas beta. Estes estudos também indicaram que não houve alteração significativa na conformação tanto do  $\gamma$ CdcPLI ou da PLA<sub>2</sub>-símile BnSP-7. Os resultados obtidos por análises de espalhamento de luz dinâmico demonstraram que o inibidor possui comportamento de oligomerização mediante variação de temperatura e quando dissolvido em H<sub>2</sub>O ou PBS. O  $\gamma$ CdcPLI foi capaz de inibir as atividades enzimática com resultado de 100% na razão 1:5 (m/m) frente as PLA<sub>2</sub> utilizadas, miotóxica por dosagem de CK e citotóxica por MTT em células tEnd com característica de ser dose não dependente. Estudos estruturais e funcionais deste inibidor poderão

contribuir para a compreensão dos mecanismos de ação dos inibidores de PLA<sub>2</sub>s, bem como na investigação de seu uso como auxiliar no tratamento do envenenamento ofídico ou doenças inflamatórias.

**Palavras-chave:** Inibidores de PLA<sub>2</sub>, Inibidores tipo  $\gamma$ , *Crotalus durissus collilineatus*, Fosfolipases A<sub>2</sub>, Serpentes

**Abstract:** Some animals have a natural resistance to toxic effects induced by snake venom due to presence of natural endogenous inhibitors in their plasma. Snake venom contains inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) that inhibit the enzymatic and pharmacological activities of PLA<sub>2</sub>. In this work we show the isolation, structural and biochemical characterization of a new PLA<sub>2</sub> inhibitor from *Crotalus durissus colillineatus* (*Cdc*) snake serum by two chromatographic steps. Initially, the *Cdc* serum was applied to a column of ion exchange Q-Sepharose Fast Flow, producing six peaks of absorbance at A280nm (Q1 to Q6). Subsequently, Q4 fraction (best results to inhibition) was applied to affinity chromatography with immobilized HiTrap NHS-BnSP-7. This fractionation resulted in two fractions (NHS-1 and NHS-2) the second fraction contained the inhibitor, named **γCdcPLI**. The molecular mass of **γCdcPLI** determined by MALDI-TOF was 22.3kDa and the primary partial structure obtained by Edman and peptide mass fingerprinting (PMF) MS (MALDI-TOF \ TOF), showed similarity when compared with the sequences of other related inhibitors. The secondary structure was evaluated for circular dichroism and showed approximately 22% alpha helix and 29% beta sheets. These studies of interaction have also indicated no significant changes in secondary structure to γCdcPLI and BnSP-7. The results obtained by analysis of dynamic light scattering (DLS) showed that the inhibitor has in oligomerization variation, according to temperature and when dissolved in H<sub>2</sub>O or PBS. γCdcPLI was able to inhibit the enzymatic, with 100% to inhibition. Cytotoxicity was assayed on Murine endothelial cell line derived from thymus hemangioma- tEnd to MTT and myotoxicity was measuring by creatine kinase (CK) showed inhibition too, but in this case the inhibition was independent dose. Structural and functional studies of this inhibitor may contribute to understanding the mechanisms of action of PLA<sub>2</sub> inhibitors. In addition, these studies may serve as starting point for investigating the potential of these inhibitors for the treatment of snake bite or inflammatory diseases.

**Keywords:** PLA<sub>2</sub> inhibitor, γ-type inhibitor, *Crotalus durissus colillineatus*, phospholipase A<sub>2</sub>, snakes

## 1.0 Introdução

No Brasil, a espécie *Crotalus durissus* é importante no cenário de acidentes ofídicos por ser responsável por grande letalidade, segundo os dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2013). A peçonha crotálica apresenta uma grande capacidade de dissociar a transmissão neuromuscular e provocar mialgia, levando o paciente a sintomas de paralisia progressiva. No ponto de vista sistêmico, a neurotoxicidade é frequentemente acompanhada de rabdomiólise com necrose tubular aguda e insuficiência renal, tal característica do envenenamento representa a principal causa de óbitos (VITAL-BRAZIL, 1966; AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2009). Estas características únicas do envenenamento crotálico, são atribuídas à elevada concentração de crotoxina (WARRELL, 2004), uma neurotoxina heterodimérica constituída por um componente básico (CB, PLA<sub>2</sub>) e um componente ácido (CA, crotapotina). Estes exibem ação pré sináptica e pós sináptica, sendo classificada como uma  $\beta$  neurotoxina (BON *et al.*, 1989; BON, 1997; SAMPAIO *et al.*, 2010).

As PLA<sub>2</sub>s (E.C. 3.1.1.4) apresentam grande potencial clínico e científico por estarem relacionadas a uma grande variedade de doenças inflamatórias humanas e nos envenenamentos ofídicos (ARNI e WARD, 1996; KINI *et al.*, 2003). Estas enzimas hidrolisam especificamente a ligação 2-acil éster de 2-*sn*-fosfolipídeos, liberando ácidos graxos livres e lisofosfatídeos. Os ácidos graxos liberados, como o ácido araquidônico, podem exercer função de segundo mensageiro e precursor de eicosanóides, sendo potenciais mediadores da inflamação (DENNIS, 1997).

As PLA<sub>2</sub>s presentes nas peçonhas de serpentes da família Viperidae possuem massa molecular variando de 14 a 18 kDa. Apresentam alto grau de similaridade sequencial e cinco a oito pontes dissulfeto que garantem sua estabilidade estrutural (FRANCISCHETTI *et al.*, 1998; KINI, 2003; MASUDA *et al.*, 2005). As PLA<sub>2</sub>s de peçonhas estão reunidas em dois grupos principais: Asp49 e PLA<sub>2</sub>-símile Lys49. As PLA<sub>2</sub> Asp49 são assim chamadas porque possuem um resíduo de aspartato na posição 49, apresentando alta atividade catalítica sobre substratos artificiais e as PLA<sub>2</sub>-símile Lys49 possuem um resíduo de lisina na posição 49, apresentando pouca ou nenhuma atividade catalítica (ARNI; WARD, 1996; OWNBY *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2004).

As PLA<sub>2</sub>s são responsáveis por uma variedade de efeitos farmacológicos, tais como neurotoxicidade, mionecrose, cardiotoxicidade, atividade hemolítica, hemorrágica, hipotensora, inibição da agregação plaquetária e anti-coagulação (GUTIERREZ; LOMONTE, 1997; OWNBY, 1998; OWNBY *et al.*, 1999). Essas atividades se relacionam com a atividade enzimática ou podem ser totalmente independente dela (KINI; EVANS, 1989; KINI, 1997).

É reconhecida a existência de diversos compostos capazes de neutralizar a peçonha e toxinas de serpentes, como os anticorpos, agentes químicos, compostos de origem vegetal e animal. Dentre esses, destacam-se os inibidores de PLA<sub>2</sub>s (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003).

Os inibidores de PLA<sub>2</sub>s são glicoproteínas ácidas obtidas a partir do sangue e produzidas no fígado de alguns animais, como serpente e mamíferos ofiófagos. Estes funcionam como um mecanismo de defesa aos efeitos deletérios de um envenenamento acidental. O primeiro relato de um inibidor de PLA<sub>2</sub>s isolado foi encontrado no plasma da serpente *Trimeresurus flavoviridis* por Kihara e colaboradores (1976) (KINKAWA *et al.*, 2010, DOMONT *et al.*, 1991, FAURE, 2000). Estas proteínas são classificadas em três tipos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  de acordo com seus aspectos estruturais, baseando-se em domínios estruturais comuns, encontrados em diferentes proteínas com propriedades fisiológicas distintas (INOUE *et al.*, 1991; THWIN *et al.*, 2002).

O inibidor do tipo  $\gamma$  ( $\gamma$ PLI), destaque neste estudo, são os que apresentam o maior número de subunidades protéicas, com massa molecular variando de 90 a 130 kDa, compostos por 3-6 subunidades não covalentes de massa 20-31 kDa. São conhecidos por apresentarem dois conjuntos de repetições intramoleculares de domínios ricos em cisteína, denominados motivo *Three-fingers* (OHKURA *et al.*, 1999; ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2008). Este domínio é responsável pelo reconhecimento da região de ligação do Ca<sup>2+</sup> de PLA<sub>2</sub>s, fato que garante o alto espectro de inibição em todos os grupos de PLA<sub>2</sub>s (IA, IIA e IIIA) ácidas ou básicas (DUNM, 2001).

Considerando o potencial clínico e biotecnológico de inibidores de PLA<sub>2</sub>s, o presente trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar química, funcional e estruturalmente um novo inibidor de PLA<sub>2</sub> presente no soro da serpente *Crotalus durissus collilineatus*.

## 2.0 Material e Animais

### 2.1 Reagentes

Colunas de cromatografia Q-Sepharose *Fast Flow*, Afinidade NHS (N-hydroxysuccinimide) Hi-Trap GE Health Care e coluna RP-C4 Grace Vydac (250 mm x 4,6 mm). Acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, SDS, EDTA, azul de bromofenol, coomassie Brilliant Blue R-250, glicina, soroalbumina bovina, persulfato de amônio e  $\beta$ -mercaptoetanol Sigma Chem. Co. Padrão de peso molecular foi obtido da GE Health Care. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) Sigma. Os demais reagentes utilizados neste estudo foram de grau analítico.

### 2.2 Peçonha e toxinas

As peçonhas de *Bothrops pauloensis* e *Bothrops jararacussu* foram obtidas a partir de espécimes mantidas no Serpentário Proteína Bioativas LTDA, estabelecido na Fazenda Boa Esperança S/N – Zona Rural – Batatais/SP. Este serpentário possui comprovante de registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (nº de cadastro: 471301). A peçonha liofilizada foi pesada, dissolvida em salina tamponada (PBS) pH 7,2 e centrifugada a 3.000 xg por 10 min. O sobrenadante foi coletado e imediatamente utilizado nos testes de inibição. As PLA<sub>2</sub>s-símile Lys49 BnSP-7 e Asp49 BpPLA<sub>2</sub>-TXI de *Bothrops pauloensis* e Asp49 BthTX-II de *Bothrops jararacussu* foram obtidas de acordo com as metodologias descritas por Soares e colaboradores (2000), Ferreira (2011) e Homsí-Brandeburgo e colaboradores (1988), respectivamente.

### 2.3 Obtenção do soro

Os espécimes de *Crotalus durissus collilineatus* (*Cdc*) foram mantidos no Setor de Manutenção de Répteis, coordenado pela Profa. Dra. Vera Lúcia de Campos Brites. Este setor possui registro desde 1995 pelo Instituto Brasileiro do

Meio Ambiente dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), enquadrando-se na categoria Criadouro Conservacionista da Fauna Silvestre – finalidade científica.

O sangue das serpentes foi coletado a cada 30 dias pelo veterinário Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos, Coordenador Técnico do Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). O soro de *Cdc* foi obtido após a centrifugação do sangue a 5.000 x g por 10min à 4°C e foi armazenado à -20°C para realização dos ensaios de inibição e purificação. Este projeto recebeu parecer favorável pelo Comitê de Ética e Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob Protocolo de nº 059/10.

## **2.4 Animais**

Camundongos da linhagem *Balb-c* machos, (20-25 g) foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos sob condições padrões de temperatura 25°C, umidade relativa do ar de 60-65%, ciclo de 12h de luz/noite, dieta e água *ad libitum*. Os procedimentos a serem realizados com animais apresentados na presente proposta foram previamente aprovados pelo do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA, número do protocolo 059/10) da Universidade Federal de Uberlândia e está em acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

## **3.0 Métodos**

### **3.1 Isolamento do inibidor de fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) presente no soro da serpente *Crotalus durissus colillineatus***

#### **3.1.1 Cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose *fast flow***

O inibidor de PLA<sub>2</sub> foi isolado a partir do soro de espécimes da serpente *C. d. colillineatus* utilizando-se dois passos cromatográficos. Inicialmente, cerca de 120mg do soro de *Cdc* foram diluídos em tampão fosfato de sódio 0,05M pH 6,5 e centrifugados 5000 x g por 10min. O sobrenadante foi posteriormente aplicado em uma coluna de troca iônica, Q-Sepharose *fast flow* (GE Healthcare) previamente

equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,05M pH 6,5. A eluição das proteínas do soro ocorreu com o tampão fosfato de sódio 0,05M pH 6,5 em diferentes concentrações de NaCl 0,2M, 0,35M, 0,5M e 0,7M a um fluxo de 12mL/h a temperatura de 25°C. As frações obtidas (Q1 a Q6) foram monitoradas a 280nm em espectrofotômetro Ultrospec 1000 UV/visível (Pharmacia Biotech). As frações foram reunidas, liofilizadas e armazenadas à -20°C.

### 3.1.2 Cromatografia de afinidade

Cerca de 500µg da fração Q4, obtida do fracionamento do soro de *Cdc* em Q-sepharose, foi aplicado a uma coluna de afinidade NHS Hitrap (N-hydroxysuccinimide) previamente imobilizada com a PLA<sub>2</sub> BnSP-7. A montagem da coluna foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. Para efetuar a ligação da PLA<sub>2</sub> (BnSP-7) foi utilizado um tampão de acoplamento (0,2 M NaHCO<sub>3</sub> + 0,5 M NaCl pH 8,3), sendo que a enzima foi ressuspendida neste tampão na concentração de 0,5-10 mg/mL de proteína. A coluna foi lavada com HCl 1mM gelado para retirada do isopropanol presente. Após tal procedimento foi injetado 1ml da solução ligante (Tampão de acoplamento+Enzima), a coluna foi vedada e deixada em repouso por cerca de 24h a 4°C.

Para lavagem e desativação da coluna foram utilizados dois tampões, o tampão A (0,5 M etanolamina, 0,5 M NaCl pH 8,3) e o tampão B (0,1 M Acetato, 0,5 M NaCl pH 4). Estes tampões foram injetados alternadamente, completando 6ml de cada tampão completando em um ciclo de seis aplicações. Após este ciclo foram injetados 2ml de um tampão com pH neutro para efetuar o ajuste de pH da coluna. A coluna acoplada ao sistema de cromatografia AKTA PRIME GE-Health Care foi inicialmente equilibrada com tampão Tris- HCl 10 mM/L pH 7,5. A cromatografia iniciou-se com o mesmo tampão para que proteínas que não apresentassem afinidade à PLA<sub>2</sub>s fossem retiradas da coluna. Em seguida, as proteínas que interagiram com a resina foram eluídas com o tampão Glicina 100 mM/L pH 2. Esta fração de interesse, contendo o inibidor, foi neutralizada com um tampão de neutralização (Tris-HCl 1 M , pH 8).

### **3.1.3 Cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC)**

Amostras do inibidor de PLA<sub>2</sub> (1 mg) foram preparadas em 500 µL de solvente A (0,1% ácido trifluoracético, v/v e acetonitrila 5%, v/v) e aplicadas ao sistema de cromatografia líquida de fase reversa de alta performance (RP-HPLC) em coluna RP-C4 Vydac (250 mm x 4,6 mm) (GE Healthcare Bio-Sciences). A coluna foi previamente equilibrada com solvente A e eluída com o solvente B (acetonitrila 80%, v/v e ácido trifluoracético 0,1%, v/v). Esta cromatografia foi realizada com o gradiente de concentração linear de 0 - 100% do solvente B a um fluxo de 0,5 mL/min.

### **3.2 Dosagem protéica**

As dosagens de proteínas em soluções foram realizadas utilizando o método estabelecido por Bradford (1976). As determinações das concentrações de proteínas foram realizadas em triplicatas e a absorbância medida a 595 nm. Paralelamente à dosagem de proteínas foi construída uma curva padrão de soroalbumina bovina (1 mg/mL), considerando o coeficiente de extinção molar em 280 nm (0,665). A concentração de proteínas em µg/µL foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos na curva padrão.

### **3.3 Caracterização Bioquímica**

#### **3.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)**

As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida a 12 % (m/v) em condições redutoras, na presença de SDS e β-mercaptoeanol, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970), com algumas modificações. O sistema de SDS-PAGE descontínuo consistiu de: gel de empilhamento a 3%, contendo Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) e SDS a 0,1% (m/v) e gel de separação a 12% contendo Tris-HCl 2,0 M pH 8,8 e SDS 0,1% (m/v), mantendo a relação de bis:acrilamida 0,8:30. Todos os géis foram preparados num sistema de eletroforese *Hoefler SE 260 Mighty Small II Mini-Vertical*. As amostras foram dissolvidas em um tampão

de Tris-HCl 0,06 M pH 6,8; SDS 2% (m/v);  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (v/v); azul de bromofenol 0,005 % (m/v) e glicerol 10% (v/v). Em seguida as amostras foram aquecidas por 5 minutos a 100°C. O tampão do eletrodo continha Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M e SDS 0,1% (m/v), pH 8,3. O gel foi corado em solução de coomassie blue- R250 0,1% (m/v) em água, ácido acético 10% (v/v) e metanol 50% (v/v) e descorado em solução de ácido acético a 7% (v/v) e etanol 30% (v/v) para posterior análise.

A massa molecular do inibidor isolada foi estimada pela interpolação de uma curva logarítmica linear da massa molecular relativa das proteínas do padrão de massa molecular versus a distância de migração no gel. O padrão de massa molecular consistia nas proteínas: Albumina Bovina 66 kDa; Ovoalbumina 45 kDa; Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 36 kDa; Anidrase carbônica 29 kDa; Tripsinogênio 24 kDa; Inibidor de tripsina 20,1 kDa;  $\alpha$ -lactoalbumina; 14,2 kDa.

### **3.3.2 Determinação da massa MALDI-TOF**

A massa molecular do inibidor de PLA<sub>2</sub>s foi determinada por espectrometria de massas com ionização e dessorção de matriz assistida por laser (MALDI-TOF-MS) (*Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry*). As análises foram feitas em espectrofotômetro de massas tipo duplo TOF com fonte MALDI (MALDI-TOF/TOF, modelo AutoFlex III Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Cerca de 100  $\mu$ g do inibidor liofilizado foi ressuspendido em 10  $\mu$ L de 0,1% ácido trifluoracético/H<sub>2</sub>O e posteriormente 0,5  $\mu$ L dessa solução foram misturados com 0,5  $\mu$ L de solução matriz de ácido sinapínico a 10 mg/ml em Acetonitrila (ACN): Ácido trifluoroacético 0,1 %. Estas misturas foram aplicadas diretamente na placa MALDI TARGET (Bruker Daltonis), onde foram homogeneizadas e secas à temperatura ambiente. Para calibragem do equipamento foi utilizado misturas de proteína padrão (Tripsinogênio, Proteína A, Albumina-bovina) também aplicadas na mesma placa. Os espectros de massa foram adquiridos no modo linear positivo, após calibragem do aparelho com padrões de proteínas (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A faixa de massas moleculares avaliada foi de 3.000-80.000 m/z.

Os experimentos descritos nos itens 3.3.2, 3.4.1, 3.4.2 foram realizados no Laboratório de Serviço de Bioquímica de Proteínas de Venenos Animais-FUNED, Belo Horizonte, em colaboração com a Profa. Dra. Márcia Helena Borges.

### **3.4 Caracterização Estrutural**

#### **3.4.1 Análise automatizada da sequência de aminoácidos**

O inibidor foi sequenciado segundo a técnica por degradação de Edman de acordo com o seguinte protocolo. Primeiramente, 1 mg da amostra foi reduzida e alquilada com 4-vinil piridina. A amostra foi diluída em 1 mL de Tris-HCl (0,1 M e pH 8) e Guanidina-HCl 6 M. Depois da adição de 30 µL de β-mercaptoetanol, a amostra foi primeiramente incubada a 50°C por 4h, e com 40 µL de 4-vinil piridina a 37°C por 2 horas no escuro. Posteriormente, a amostra foi dessalinizada em uma coluna P10 (GE, healthcare). A proteína foi clivada por tripsina (2% m/m, enzima: substrato em 1 mL de 0,1 M de bicarbonato de amônio, pH 7,9) por 4,5h a 37°C. Os produtos de clivagem foram separados por uma coluna Vydac C18 (4,6 x 250 mm) usando um gradiente linear de 0 a 50% de acetonitrila em solução de 0,1% TFA e a sequência determinada utilizando o sequenciador de proteínas Shimadzu PPSQ-21A. A estrutura primária dos peptídeos foi comparada com outras sequências do banco de dados relatadas no SWISS-PROT/TREMBL usando os programas FASTA3 e o BLAST.

#### **3.4.2 Espectrometria de massas (MALDI TOF/TOF) e Análise de Bioinformática**

Cerca de 100 µg do inibidor foi solubilizado em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 mM e Ureia 8 M, durante 20 min. Esta mistura foi submetida a redução com DTT 10 mM em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM, a 37 °C durante 60 min. Para alquilação, foram adicionados 50 mM de iodoacetamida em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM a 37 °C durante 30 min. Uma alíquota de tripsina *Gold* 0.5 µg/2.5 µL (Promega, Madison, WI, EUA) foi adicionada para prosseguir a digestão a 37 °C durante à noite. A reação foi interrompida pela adição de TFA a 1% e a mistura de fragmentos obtidos da digestão com a tripsina foram concentrados em *Speed-Vac* (Savant SPD121P). A mistura de peptídeos

foi dessalinizada utilizando um cartucho C18 acoplado ao sistema HPLC. Para cada análise, 1 µL da amostra foi adicionado a 3 µL da matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico ( $\alpha$ -CHCA), e posteriormente 1 µL desta mistura foi aplicado sobre uma placa (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e seca à temperatura ambiente.

Análise por espectrometria de massa foi realizada por MALDI TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*) utilizando um dispositivo Autoflex III MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, EUA), controlada pelo *software FlexControl 3.1* (Bruker Daltonics, Billerica, EUA). O *software Flex 3,3* (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) foi utilizado para a análise de dados de espectrometria de massa. As massas peptídicas monoisotópicas foram obtidas em modo refletor com calibração externa, utilizando-se um padrão de calibração de peptídeos (Bruker Daltonics, Billerica, EUA). Espectros de peptídeos (MS/MS) foram realizados pela fragmentação LIFT. Os espectros de massa foram analisados com o *software Biotoools* (Bruker Daltonics) e a identificação da proteína realizada com o *software Mascot*. As pesquisas foram obtidas no banco de dados NCBI, as sequências homólogas foram obtidas a partir do banco de dados NCBI usando o algoritmo BLASTP. Para alinhamento das sequências depositadas com os fragmentos obtidos foi utilizado o programa ClustalW.

### **3.4.3 Dicroísmo circular (CD)**

Os experimentos descritos nos itens 3.4.3 e 3.4.4 foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural (LBME) do Departamento de Física e Biofísica - Instituto de Biociências-UNESP, em colaboração com o Prof. Dr. Marcos Roberto de Matos Fontes.

Para a análise da estrutura secundária e interação do complexo inibidor/enzima foi utilizado o equipamento *Jasco J-815* com os programas *Spectra Manager™ II* e *CDPro*. As medidas de CD foram realizadas utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,5 mm com os seguintes parâmetros: *scanning speed* 100 nm/min; *band width* 1nm; *step resolution* 0.5 nm, temperatura 20°C para as medidas do inibidor  $\gamma$ CdcPLI (340 µg/ml) e 37°C para as medidas da interação inibidor-BpPLA<sub>2</sub>-TXI (700 µg/ml), a solução diluente utilizada foi água deionizada.

Cada espectro corresponde à média de 10 acumulações com o branco já devidamente subtraído. Os espectros das fosfolipases A<sub>2</sub> foram coletados no intervalo de 185-260 nm e do inibidor no intervalo de 195-260 nm. Todas as amostras foram analisadas na presença de fluxo de N<sub>2</sub> para que O<sub>2</sub> presente no ar não interferisse na leitura dos dados dentro do equipamento.

#### **3.4.4 Análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS)**

O inibidor foi analisado por DLS visando obter características de agregação (calculado a partir do grau de polidispersividade da amostra) e estimativa do estado oligomérico (calculado a partir do raio hidrodinâmico). Para foi utilizado o equipamento de DLS da Wyatt Inc.Technology, modelo DynaPro TITAN e o programa Dynamics V.6.10 (fornecido pela Wyatt Tech).

#### **3.5. Estudos de inibição das atividades biológicas de PLA<sub>2</sub>s**

Todos os estudos de inibição foram conduzidos após a pré-incubação do inibidor com as PLA<sub>2</sub>s (BnSP-7, BpPLA<sub>2</sub>-TXI e Bth-TxII) em diferentes razões de toxina:inibidor (m/m) por 30 min a 37°C antes dos testes.

##### **3.5.1 Atividade Fosfolipásica A<sub>2</sub>**

A atividade PLA<sub>2</sub> foi realizada por titulação potenciométrica como descrito por De Haas e Postema (1968). O substrato utilizado consistia em uma emulsão de gema de ovo na presença de desoxicolato de sódio 0,03 M e CaCl<sub>2</sub> 0,6 M. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com uma solução padrão de NaOH 0,1208 M em pH 8,0 e temperatura ambiente. A atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> foi expressa em microequivalentes de base consumida por minuto por µg de proteína (µEq de NaOH/min./mg). Em cada ensaio foram utilizados 5 µg da PLA<sub>2</sub> de *Bothrops pauloensis* (BpPLA<sub>2</sub>-TXI) e 10 µg da PLA<sub>2</sub> de *B. jararacussu* (BthTX-II).

### 3.5.2 Atividade citotóxica

Para este experimento foram utilizadas células endoteliais murinas da linhagem tEnd (Thymic endothelium), estabelecida por Bussolino *et al.* (1991). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 acrescido com 10% de soro fetal bovino e suplementado com 2 mM de L-glutamina, 2 mM de piruvato de sódio, 1 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, mantidas em estufa 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

A viabilidade celular de culturas de células tEnd tratadas com a PLA<sub>2</sub> BnSP-7 foi quantificada pela atividade da succinil desidrogenase, uma enzima mitocondrial presente somente em células vivas, cujo o substrato é o MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Para determinar a viabilidade, 1,5x10<sup>4</sup> células/poço foram semeadas em microplacas de cultura de 96 poços. Após a adesão, o meio foi trocado e as células foram tratadas com a BnSP-7 (25 µg/mL) e BthTX-II (50 µg/mL) ou BnSP-7/BthTX-II inibidas com diferentes concentrações do inibidor, razões de 1:0,5 a 1:5 (m/m) por um período de 24 horas. Culturas tratadas apenas com meio de cultura foram utilizadas como controle negativo. Após 24 horas de incubação, foram adicionados diretamente sobre o meio de cultura 20 µL de uma solução contendo 5 mg/mL de MTT e a cultura mantida a 37°C por 3h. Após este período, foram adicionados 100 uL de uma solução de SDS 10%/HCl 0,01 M durante um período de 18h. A intensidade da reação foi determinada pela leitura da densidade óptica a 570 nm em um leitor de ELISA (BioTeK – Elx50).

### 3.5.3 Atividade Miotóxica por dosagem de Creatina Cinase

Camundongos *Balb-c* machos (20 - 25g, n=4) receberam por via intramuscular (*im*) no músculo gastrocnêmio direito doses de 10 µg contendo a PLA<sub>2</sub> BnSP-7. Três horas depois os camundongos foram previamente anestesiados com (ketamina® 10% (0,05 ml/kg) + xilasina® 2% (0,025 ml/kg) e sacrificados por deslocamento cervical. O sangue coletado por punção cardíaca foi centrifugado a 2.500 x g por 10 minutos a 4°C. A quantificação dos níveis de creatina cinase (CK-EC. 2.7.3.2) no plasma obtido foi determinada utilizando a

metodologia descrita no Kit CK-UV kinetic (Biotécnia). A atividade foi expressa em unidades por litro (U/L), cada unidade corresponde à produção de 1  $\mu\text{mol}$  de NADH por minuto a 30°C. Para este ensaio foram formados os seguintes grupos: Controles (animais receberam somente PBS ou diferentes doses de inibidor: 10 e 30  $\mu\text{g}$ ); Testes (animais receberam amostras contendo BnSP-7:inibidor na razão 1:1 e 1:3, m/m).

### 3.6 Análises estatísticas

A montagem dos gráficos, cálculos das médias e desvios padrões das médias foram realizados com auxílio do software Prisma 5.0. Significâncias estatísticas dos resultados foram determinadas utilizando o teste ANOVA e Kruskal-Wallis. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

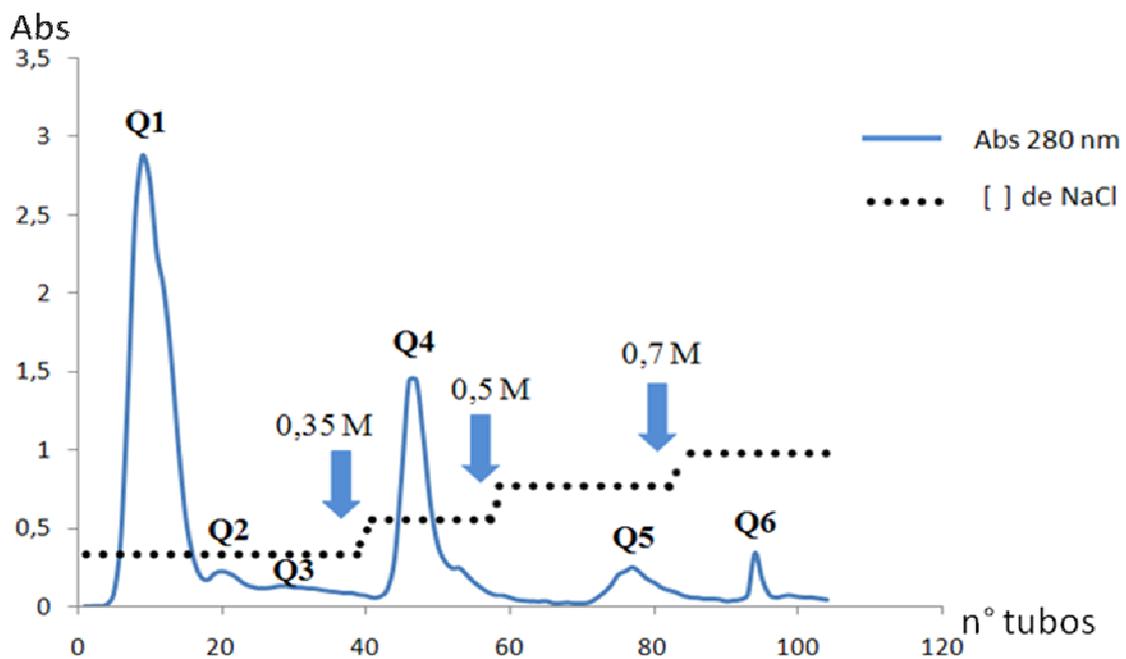
## 4.0 Resultados

### 4.1 Isolamento e caracterização bioquímica do inibidor de PLA<sub>2</sub> tipo $\gamma$

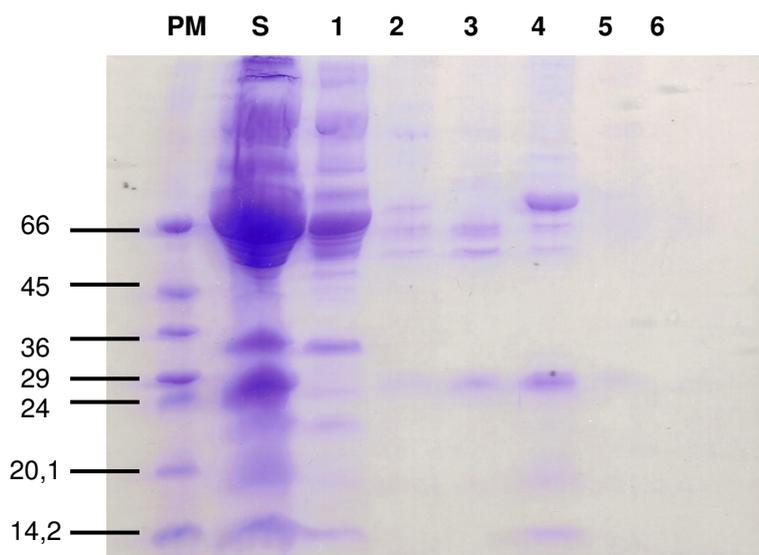
O fracionamento de 120 mg do soro obtido após centrifugação do sangue da serpente *Cdc*, foi realizado em coluna cromatográfica de troca-iônica em Q-Sepharose resultando em seis frações principais denominadas (Q1, Q2, Q3, Q4, Q5 e Q6) (**Figura 1**). Nesta primeira etapa testes preliminares demonstraram que o gradiente descontínuo apresentou melhores resultados quando comparado ao gradiente linear (dados não mostrados). Estas foram reunidas em *pools*, liofilizadas e armazenadas a -20° C. Em análises por SDS-PAGE 12% (**Figura 2**) a fração Q4 apresentou duas bandas majoritárias de massa molecular de aproximadamente 66 kDa e 24 kDa, além de outros contaminantes em menores proporções. As demais frações (Q1, Q2, Q3) apresentaram diversas bandas proteicas, e as frações Q5 e Q6 não foram visualizadas no gel (**Figura 2**). A fração Q4, que demonstrou maior inibição (**Tabela 2**), foi aplicada a coluna de afinidade previamente imobilizada com a PLA<sub>2</sub> BnSP-7 resultou em dois picos de absorbância a 280 nm (NHS-1 e NHS-2) (**Figura 3A**). A fração NHS-2, contendo a proteína de interesse foi posteriormente liofilizada e visualizada em SDS-PAGE a 12% em condições redutoras, revelando uma massa aparente de 24 kDa

(**Figura 3B**). Esta proteína, denominada de  **$\gamma$ CdcPLI**, representou 2,6% do total proteico do soro de *Cdc* (**Tabela I**) e foi posteriormente aplicada em uma coluna de fase reversa (C4/RP-HPCL) (**Figura 4A**). Amostras obtidas após RP-HPLC foram utilizadas para a determinação da massa por MALDI-TOF, sequenciamento por degradação de Edman e MS/MS, análises de dicroísmo circular e espalhamento de luz dinâmico.

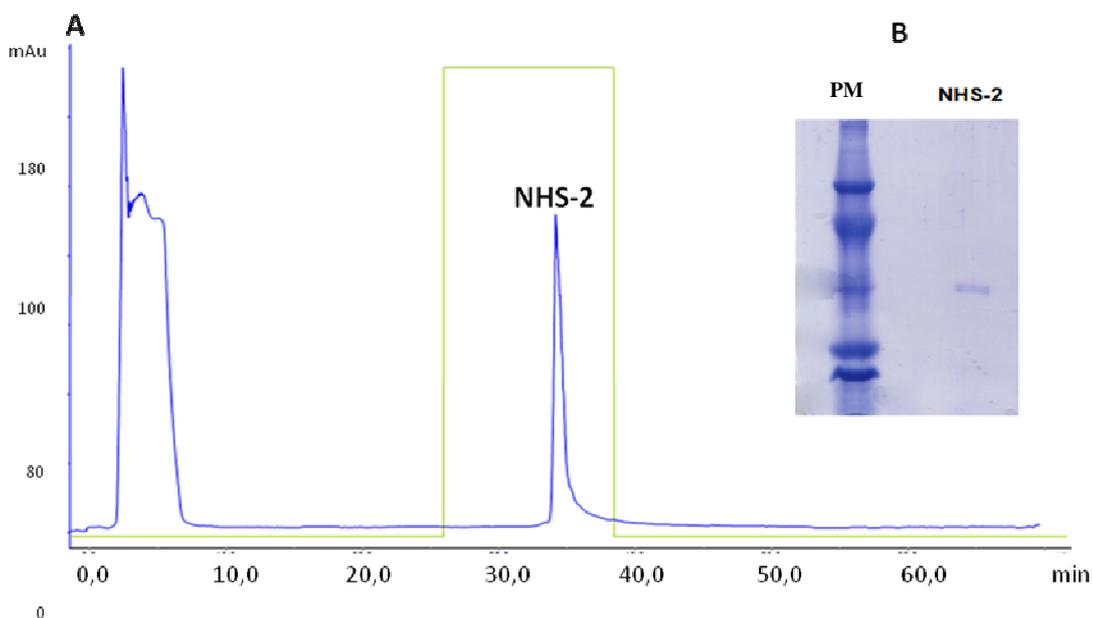
As análises por SDS-PAGE (12%) em condições redutoras para estimativa da massa molecular do inibidor de PLA<sub>2</sub>s, revelou um único componente com massa molecular estimada de 24 kDa (**Figura 4B**). A massa real atribuída para a proteína, de acordo com a técnica de MALDI-TOF foi de 22.34 kDa, como mostra a **Figura 5**. É possível verificar nesta figura também o valor da massa da proteína duplamente carregada.



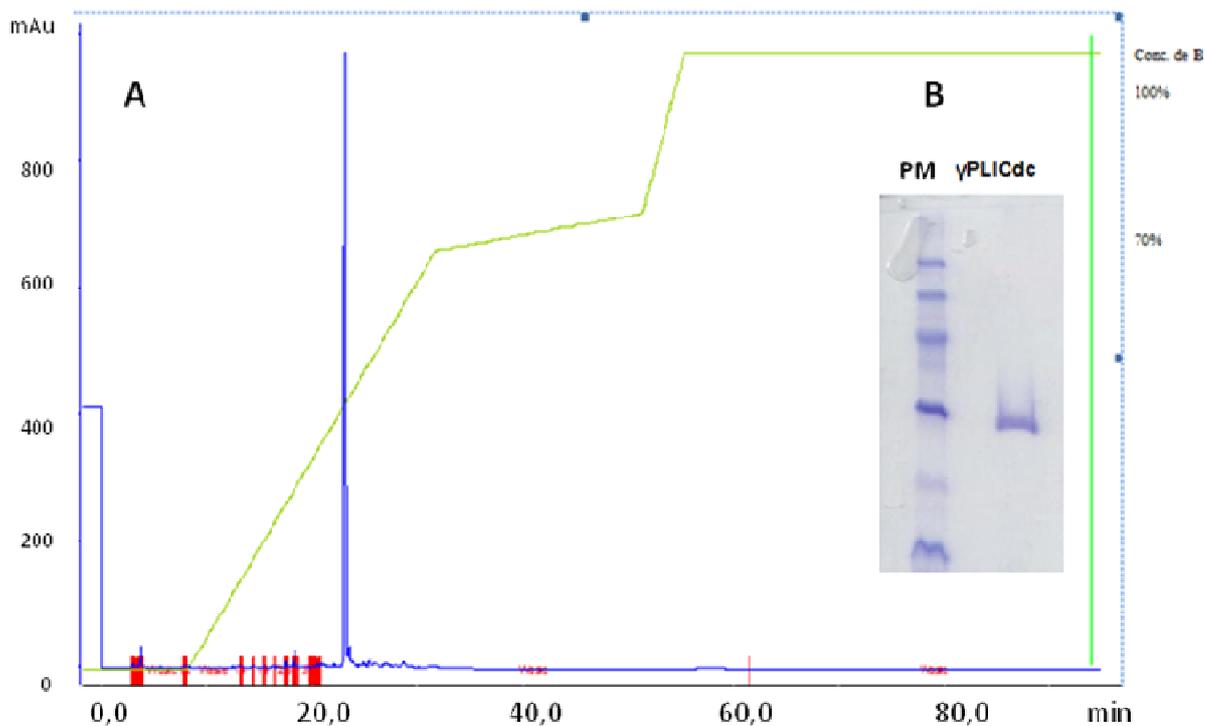
**Figura 1-** Fracionamento de 120 mg do soro de *Cdc* em coluna Q-Sepharose *Fast Flow* equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,5M, pH 6,5 e 0,02M de NaCl. Frações de 1mL/tubo foram coletadas utilizando um fluxo de 12mL/h, a temperatura ambiente. A eluição foi realizada com o mesmo tampão, em concentrações crescentes de NaCl (0,35, 0,5 e 0,7 M).



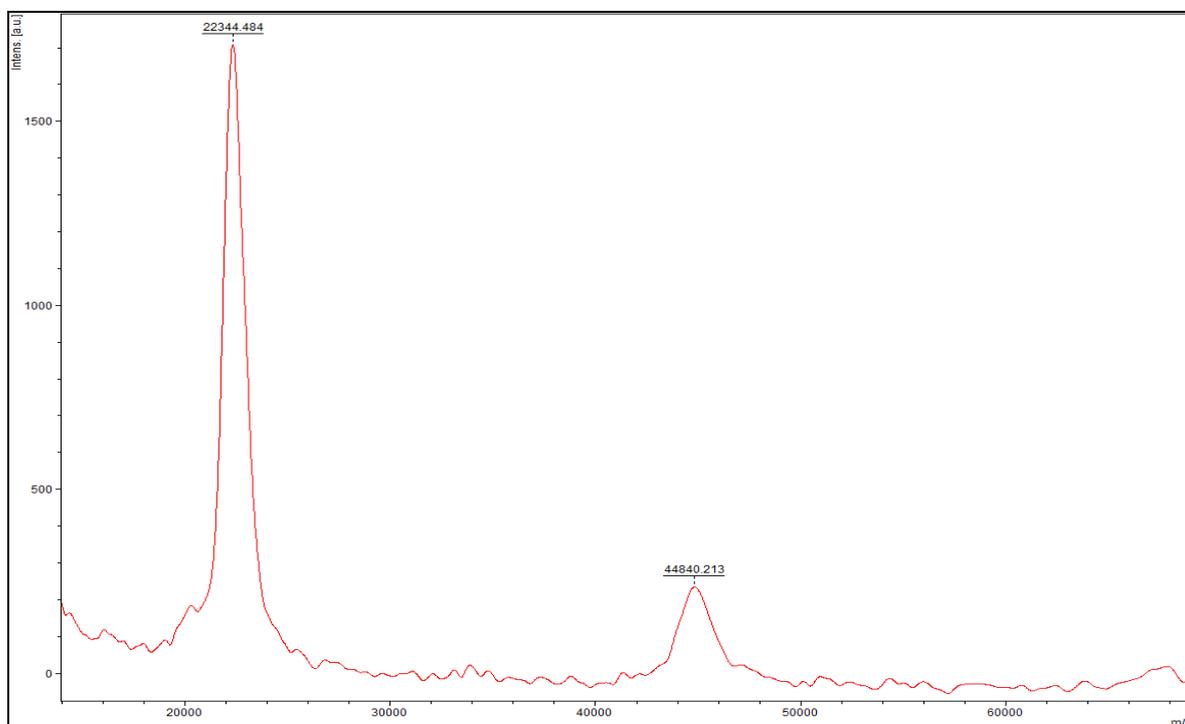
**Figura 2:** Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) em condições desnaturantes do soro total de *Cdc* e frações obtidas da cromatografia em Q-sepharose: **PM**- Padrão de peso molecular; **S**- Soro total; **1**- Q1; **2**- Q2; **3**-Q3; **4**-Q4; **5**-Q5; **6**-Q6. Tempo de corrida 57 min a 20 mA. O gel foi corado com coomassie Brilliant Blue R-250 a 2,5% por 10 min. e em seguida descorado em ácido acético 10%, etanol 30% e água deionizada. Padrão de massa molecular (PM): Albumina Bovina 66 kDa; Ovoalbumina 45 kDa; Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 36 kDa; Anidrase carbônica 29 kDa; Tripsinogênio 24 kDa; Inibidor de tripsina 20,1 kDa;  $\alpha$ -lactoalbumina; 14,2 kDa.



**Figura 3:** (A) Perfil cromatográfico de 500 µg da fração Q4 em coluna de afinidade NHS imobilizada com a PLA<sub>2</sub> BnSP-7, equilibrada com Tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e eluída com tampão glicina 100 mM pH 2,5. Fluxo de 0,5 ml/tubo. Com o eixo X representando os tubos numerados e o eixo Y representando a absorbância em mAu a 280 nm. (B) SDS PAGE (12%) em condições redutoras. Tempo de corrida 75 min. a 20 mA. O gel foi corado com coomassie Brilliant Blue R-250 a 2,5% por 10 min. e em seguida descorado em ácido acético 10%, etanol 30% e água deionizada. 1- Padrão de massa molecular; 2- NHS-2. Padrão de massa molecular (PM): Fosforilase B 97 kDa; Albumina Bovina 66 kDa; Ovalbumina 45 kDa; Anidrase carbônica 30 kDa; Inibidor de tripsina 20,1 kDa; DC-lactoalbumina; 14,4 kDa.



**Figura 4:** **(A)** Perfil cromatográfico do inibidor  $\gamma$ CdcPLI em coluna RP-C4 Vydac (1 cm x 25 cm). 1mg do inibidor foi dissolvido em 550 $\mu$ L de ácido trifluoracético 0,1% (v/v). O pico foi eluído com fluxo de 1mL/min e absorvância monitorado a 280nm. Com o eixo X representando os tubos numerados e o eixo Y representando a absorvância em mAu. **(B)** SDS-PAGE (12%) 1- Padrão de massa molecular PM (97 kDa Fosforilase B; 66 kDa Albumina; 45 kDa Ovoalbumina; 30 kDa Anidrase carbônica; 20,1 kDa Inibidor de tripsina; 14,1 kDa DC-lactoalbumina). 2- Inibidor  $\gamma$ CdcPLI em condições redutoras (20% de  $\beta$ -mercaptoetanol).



**Figura 5:** Análises em espectrofotômetro de massas tipo duplo TOF com fonte MALDI (MALDI-TOF/TOF), modelo AutoFlex III Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Cerca de 100 µg do inibidor liofilizado ressuspendido em 10 µL de 0,1% ácido trifluoroacético/H<sub>2</sub>O e 0,5 µL de solução matriz de ácido sinapínico a 10 mg/ml em Acetonitrila (ACN): Ácido trifluoroacético 0,1 %.

**Tabela 1:** Rendimento proteico do inibidor obtido no fracionamento do soro de *Crotalus durissus collilineatus* em Q-Sepharose e Hitrap NHS

<b>Etapas de purificação</b>	<b>mg (totais)*</b>	<b>Recuperação (%)</b>
Soro	<b>120 mg</b>	100 %
Fração Q4	<b>12 mg</b>	10 %
$\gamma$ CdcPLI	<b>3,13 mg</b>	2,60 %

\* Dosagem realizada pelo método de Bradford (1976).

## 4.2 Estudos funcionais

### 4.2.1 Atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>

Inicialmente foi analisado o perfil inibitório do soro de *Cdc* sobre a atividade PLA<sub>2</sub> da peçonha bruta de *B. pauloensis* e da BpPLA<sub>2</sub>-TXI, nas razões de 1:5, 1:10 e 1:20 (peçonha ou BpPLA<sub>2</sub>-TXI:soro *Cdc*, m/m), com resultados significativos apenas na razão 1:20, para peçonha bruta e em todas razões para BpPLA<sub>2</sub>-TXI (**Tabela 2**).

As frações (Q1 a Q4) na razão de 1:20 (peçonha *B. pauloensis*: frações, m/m) foram testadas quanto à sua capacidade em inibir a atividade PLA<sub>2</sub> da peçonha de *B. pauloensis*. Com estes resultados pôde-se perceber que as frações Q3 e Q4 tiveram maior inibição (resultados não mostrados), porém Q4 indicou melhor ação inibitória. A fração Q4 também foi testada nas proporções 1:5, 1:10 e 1:20 (peçonha *B. pauloensis* : Q4, m/m) (**Tabela 2**). Esta conseguiu reduzir a atividade PLA<sub>2</sub> da peçonha de *B. pauloensis* em todas as proporções, diferentemente do soro total que inibiu esta peçonha apenas na razão 1:20.

O  $\gamma$ CdcPLI, isolado no presente estudo, foi capaz de inibir a atividade PLA<sub>2</sub> de BpPLA<sub>2</sub>-TXI de *B. pauloensis* em diferentes proporções, 1:1, 1:2 e 1:5 (m/m), bem como da PLA<sub>2</sub> básica purificada da peçonha de *B. jararacussu* (*BthTX-II*), nas razões 1:1, 1:3 e 1:5 (m/m). O  $\gamma$ CdcPLI demonstrou inibição dose dependente, com 100% de inibição na razão 1:5 para ambas PLA<sub>2</sub>s (**Tabela 2**).

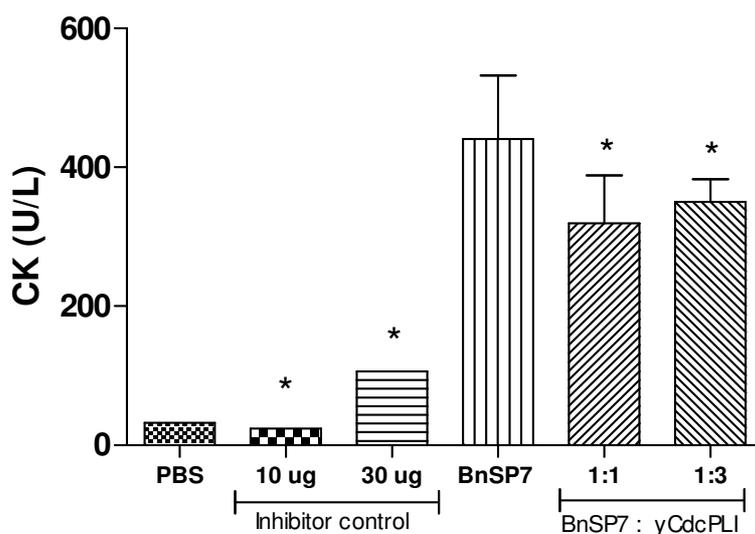
**Tabela 2-** A atividade PLA<sub>2</sub> realizada por titulação potenciométrica.

<b>Amostra</b>	<b>Razões de Inibição Amostra : Soro</b>	<b>Atividade PLA<sub>2</sub> (U/mg)</b>	<b>% de Inibição</b>
<i>B. pauloensis</i>	1:5	67,83 ± 2,74	7,60%
	1:10	64,33 ± 7,55	6%
	1:20	61,39 ± 7,02 *	12,65% *
BpPLA <sub>2</sub> -TXI	1:5	179,26 ± 4,59 *	11,80% *
	1:10	162,28 ± 8,76 *	18,05% *
	1:20	158,87 ± 6,89 *	21,23% *
<b>Amostra</b>	<b>Razões de Inibição Amostra : Q4</b>	<b>Atividade PLA<sub>2</sub> (U/mg)</b>	<b>% de Inibição</b>
<i>B. pauloensis</i>	1:5	62,63 ± 8,57 *	21% *
	1:10	59,69 ± 0,85 *	24% *
	1:20	42,58 ± 5,58 *	46% *
<b>Amostra</b>	<b>Razões de Inibição Amostra : γCdcPLI</b>	<b>Atividade PLA<sub>2</sub> (U/mg)</b>	<b>% de Inibição</b>
BpPLA <sub>2</sub> -TXI	1:1	130,0 ± 7,52 *	25% *
	1:2	98,0 ± 7,74 *	43% *
	1:5	0 *	100% *
<i>BthTX-II</i>	1:1	33,4 ± 1,41*	40% *
	1:3	26,4 ± 5,02 *	53,67% *
	1:5	0 *	100% *

\* Valores significativos de acordo com a análise estatística. Foi utilizado o teste ANOVA e Kruskal-Wallis, com significância de  $\alpha < 0,005$ , com o software Prisma 5.0

#### 4.2.2 Neutralização da atividade Miotóxica (Dosagem CK)

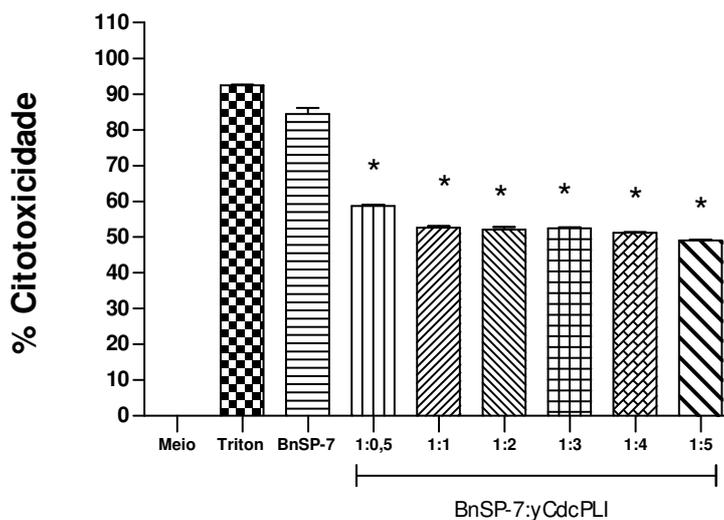
A neutralização da atividade miotóxica induzida pelo inibidor  $\gamma$ CdcPLI após a inoculação *im* de 10 $\mu$ g da PLA<sub>2</sub> BnSP-7 pré incubada com o inibidor nas razões 1:1 e 1:3 (m/m) no músculo gastrocnêmio de camundongos foi verificada pela quantificação dos níveis plasmáticos de creatina cinase (CK). Os resultados mostraram uma capacidade de neutralização significativa da atividade miotóxica, porém esta inibição não demonstrou ser dose dependente. O  $\gamma$ CdcPLI nas razões 1:1 e 1:3 (proteína:inibidor, m/m) foi capaz de inibir cerca de 27% e 21 % respectivamente a atividade miotóxica induzida pela BnSp-7. (**Figura 6**). Os grupos controles, contendo apenas inibidor nas concentrações de 10 e 30  $\mu$ g, não apresentaram aumentos significativos nos níveis plasmáticos de CK em comparação com o controle negativo PBS (**Figura 6**).



**Figura 6:** Neutralização da atividade miotóxica por dosagem de Creatina Quinase (CK) promovida PLA<sub>2</sub> (BnSP-7) e BnSP-7 pré incubada com o inibidor  $\gamma$ CdcPLI. Como controle foram utilizados, inibidor (10  $\mu$ g e 30  $\mu$ g) e PBS. Os resultados foram mostrados em U/L. (\*) Dados estatisticamente significativos em relação ao grupo controle com BnSP-7.

### 4.2.3 Neutralização da citotoxicidade de células tEnd induzidas pela PLA<sub>2</sub> BnSP-7

A neutralização da citotoxicidade induzida pela BnSP-7 em células endoteliais murinas (tEnd) foi avaliada utilizando diferentes razões toxina: inibidor (m/m) por ensaio de MTT. Os resultados mostraram uma capacidade de neutralização significativa, porém esta inibição não demonstrou ser dose dependente. Razões até 1:10 (toxina: inibidor, m/m) (resultados não mostrados) não demonstraram diferença significativa. Dessa forma, como pode ser observado na **Figura 7**, as razões 1:0,5 e 1:1 (toxina:inibidor, m/m) foram capazes de inibir aproximadamente 31% e 38%, respectivamente a citotoxicidade induzida pela BnSP-7, assim como verificado para as demais razões (toxina; inibidor, m/m) utilizadas no experimento (**Figura 7**). Os grupos controles contendo apenas inibidor não induziram toxicidade significativa (resultado não mostrado).



**Figura 7:** Inibição da citotoxicidade induzida pela BnSP-7 em culturas de tEnd. Células foram tratadas com BnSP-7 (25 µg/ml) ou BnSP-7 pré incubada com o inibidor nas razões 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 e 1:5.. Controle positivo triton 0,1%; controle negativo meio de cultura. Sendo que o símbolo (\*) indica diferença significativa quando comparado com valores da PLA<sub>2</sub> BnSP-7.

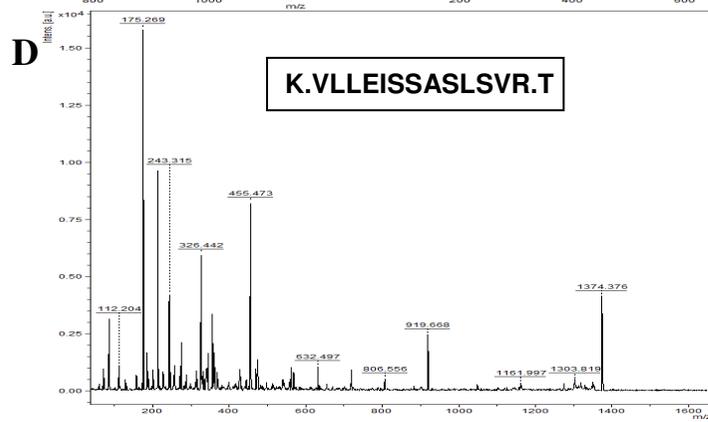
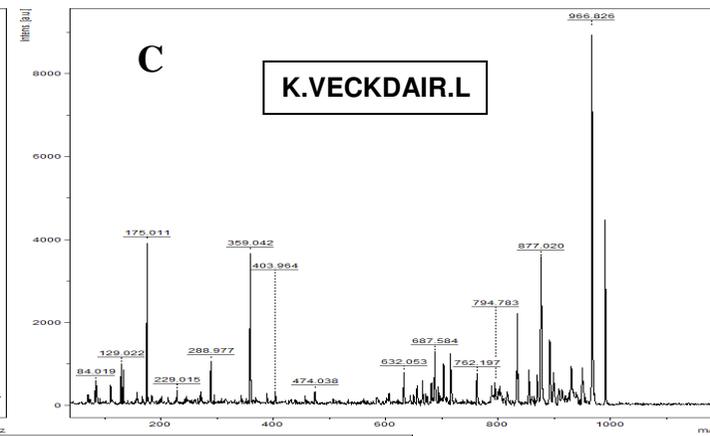
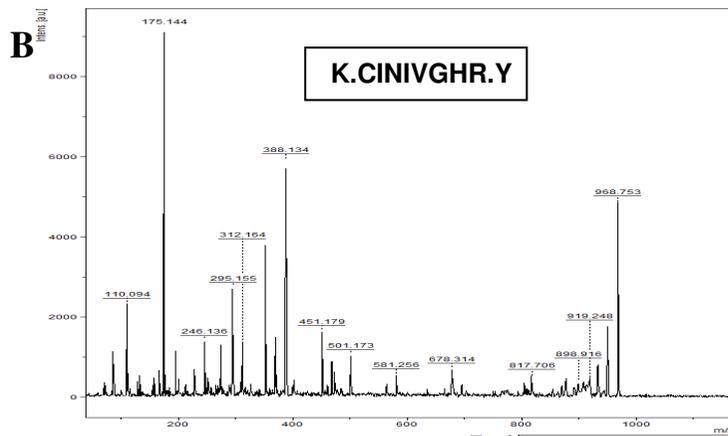
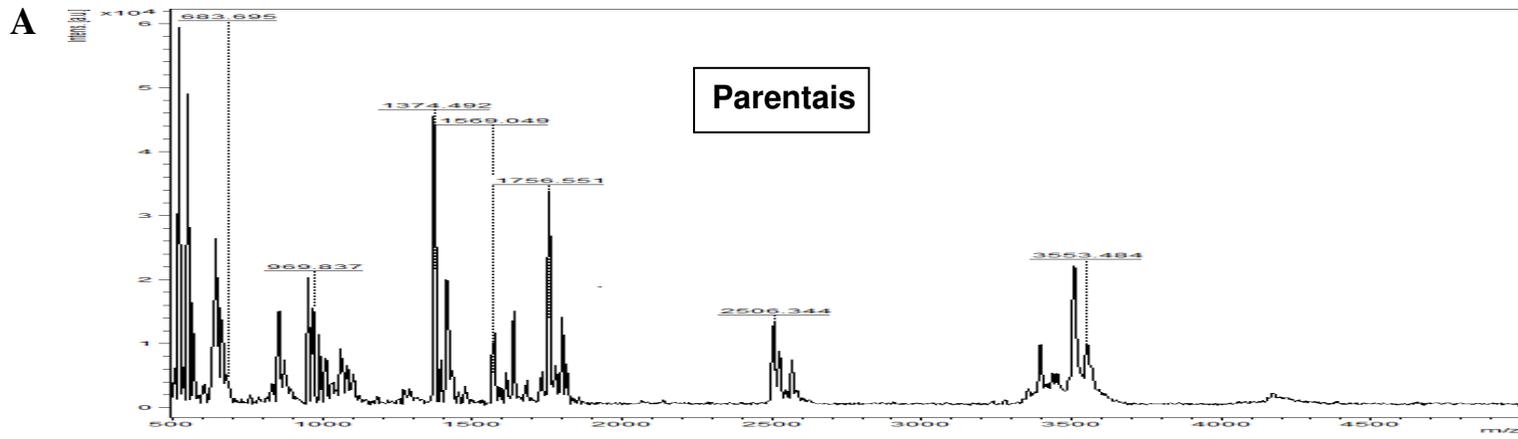
## 4.3 Estudos estruturais

### 4.3.1 Determinação da estrutura primária parcial do inibidor

O sequenciamento parcial do  $\gamma$ CdcPLI foi obtido inicialmente por espectrometria de massa. Cerca de 100 $\mu$ g da proteína foi digerida com tripsina e o espectro dos fragmentos foi analisado com o *software Biotoools* (Bruker Daltonics) e a identificação da proteína realizada com o *software Matrix Science (Mascot Search Results)* (resultados não apresentados). Para a identificação da proteína os peptídeos gerados foram submetidos às análises de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) em espectrômetro de massa tipo duplo TOF com o método *LIFT*. A figura 6 demonstra os fragmentos utilizados para realização das análises da sequência por MS/MS, bem como o espectro do inibidor tripsinizado. A partir deste perfil foi possível utilizar três parentais (**Figura 8 B, C e D**) para fragmentação e sequenciamento. A sequência destes garantiu 14% da cobertura proteica (**Figura 9** em itálico).

O sequenciamento por degradação de Edman garantiu uma maior cobertura da sequência polipeptídica do inibidor. A **Figura 9** apresenta as sequências com destaque para os fragmentos obtidos por degradação de Edman (em negrito e sublinhado). Com isso, esta técnica juntamente com o sequenciamento por MS/MS garantiu o sequenciamento de 63% da estrutura primária da proteína.

A **Figura 10** apresenta o alinhamento da sequência do inibidor com a de outros inibidores depositados no banco de dados NCBI. Este alinhamento revelou grande similaridade com outros inibidores do tipo  $\gamma$ , sendo possível classificá-lo como pertencente a este grupo. O alinhamento também demonstrou a diferença em alguns resíduos de aminoácidos nas posições (como Ser22 e Glu107) presentes na estrutura primária do  $\gamma$ CdcPLI quando comparada à estrutura primária do inibidor CNF de *Crotalus durissus terrificus* (**Figura 10**). Além disso, vale destacar as regiões de glicosilação do inibidor (destacado com retângulo rósea).



**Figura 8:** Espectro dos fragmentos utilizados no sequenciamento por MS/MS. **A:** espectro do inibidor tripsinizado; **B, C e D:** fragmentos utilizados para a análise de sequencia do inibidor  $\gamma$ CdcPLI.

-----SDFCHNIGKDCDGYEEECSSPEDVCGKVL  
 LEISSASLSVRT---NCFSSICK-----ELC  
EDQPEPGEPLSK-----DSTEYEAICK----*kCINIVGHR*  
YEQFPG----DISYNLKGCVSSCPLLSLSNATFEQNR----*KVECKDAIR*  
 L---

**Figura 9:** Sequência parcial do inibidor  $\gamma$ CdcPLI. Em destaque (negrito e sublinhado) a sequência obtida com a degradação por Edman e em itálico, a sequência para os fragmentos obtidos no seqüenciamento por MS/MS.

```

γCdcPLI          -----SDFCHNIGKDCDGYEEECSSPEDVCGKVLLEISSASLSV 39
CNF              MKYLHTICLLFIFVARGNSRSCDFCHNIGKDCDGYEEECSSPEDVCGKVLLEISSASLSV 60
LNF1             MKYLHTICLLFIFVARGNSRSCDFCHNIGKDCDGYEEECSSPEDVCGKVLLEISSASLSV 60
LNF2             MKSLHTICLLFIFVARGNSRSCDFCHNIGKDCDGYEQECSSPEDVCGKVFLEISSASLSV 60
B.alternatus    MKSLHTICLLFIFVARGNSRSCDFCHNVGKDCDGYEQECSSPEDVCGKVFLEISSASLSV 60
B.moojeni       MKSLHTICLLFIFVARGNSRSCDFCHNIGKDCDGYQQECSSPEDVCGKVFLEISSASLSV 60
                .*****:*****:*****:*****

```

```

γCdcPLI          R---NCFSSSIC-----KELCEDQPEPGEPLSK----- 64
CNF              RTVHKNCFFSSICKLGQFDVNIHGHSYIRGRINCCEKELCEDQFPFGLPLSKPNGYYCPG 120
LNF1             RTVHKNCFFSSICKLGQFDVNIHGHSYIRGRINCCEKEPCEDQLFPGLPLSKPNGYYCPG 120
LNF2             RTVHKNCFFSSICKLGQIDVNIHGHSYIRGRVNCCEKEPCEDQFPFGLPLSRPNGYYCPG 120
B.alternatus    RTVHKNCFFSSICKLGQIDVNIHGHSYIRGRINCCEKEPCEDQFPFGLPLSRPNGYYCPG 120
B.moojeni       RTVHKNCFFSSICKLGQIDVNIHGHSYIRGGINCCEKEPCEDQFPFGLPLSRPNGYYCPG 120
                *      *****                ** *      ** *      *

```

```

γCdcPLI          -----DSTEYEAIK-----CINIVGHRYEQFPGDISYNLKGCVSSCPLLSLSNATFE 112
CNF              AIGLFTKSDTEYEAIKGTETKCNINIVGHRYEQFPGDISYNLKGCVSSCPLLSLSNATFE 180
LNF1             AIGLFTKSDTEYEAIKGTQTKCNINIVGHRYEFPFGDISYNLKGCVSSCPLLSLSNATFE 180
LNF2             ALGLFTEDSTEYEAIKCHGTETKCNINIVGHRYENFPGDITYNLKGCVSSCPLLSLSNATFE 180
B.alternatus    ALGLFTEDSTEYEAIKCHGTETKCIDIVGHRYENFPGDITYNLKGCVSSCPLLSLSNATFE 180
B.moojeni       ALGLFTEDSTEYEAIKCHGTETKCIDIVGHRHEHFPGDIAYNLKGCVSSCPLLSLSNATHE 180
                *****:      **:*****:*      *****:*****

```

			Identidade
γCdcPLI	QNR-----VECKDAIR----	123	100%
CNF	QNRNYLEKVECKDAIRLASL	200	69%
LNF1	QNRNYLEKVECKDAIRLASL	200	67%
LNF2	ENRNYLQKVECKDAIRLASL	200	64%
B.alternatus	QNRNYLEKVECKDAIRLASL	200	64%
B.moojeni	QNRNYLEKVECKDAIRLASL	200	63%

```

: **      *****

```

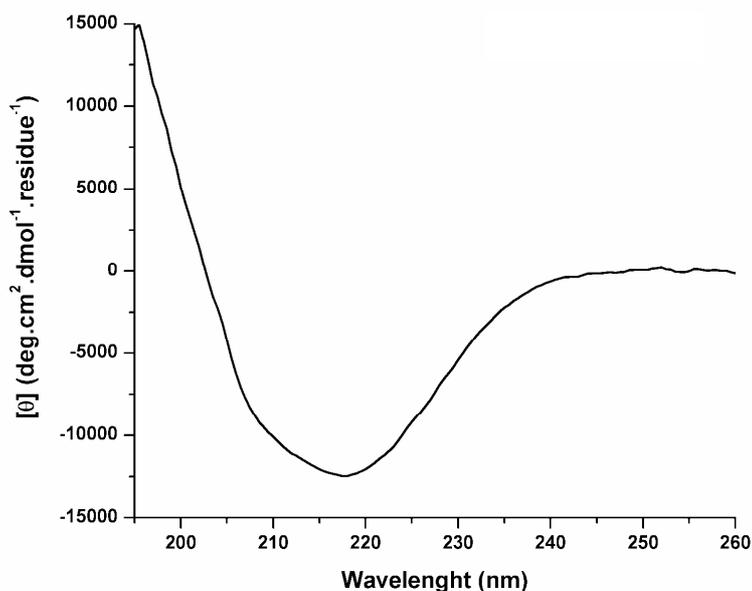
**Figura 10:** Alinhamento da seqüência do inibidor  $\gamma$ CdcPLI e outros inibidores de PLA<sub>2</sub>s obtidas do banco de dados de proteínas do BLAST (PubMed-Medline) e do Uniprot: Códigos de acesso: 86519 =  $\gamma$ CdcPLI / [Q90358.1](#) = CNF / [P60591.1](#) = LNF1 / [P60592.1](#) = LNF2 / [ABV91326.1](#) =  $\gamma$  inibitor fosfolipase A<sub>2</sub> (*Bothrops alternatus*) / [ABV91334.1](#) =  $\gamma$  inibitor fosfolipase A<sub>2</sub> (*Bothrops moojeni*). O símbolo (\*) indica os resíduos de aminoácidos iguais com outras seqüências; (.) indica

mudança de resíduos de aminoácidos com natureza diferente; (:) indica mudança de resíduos de aminoácidos de mesma natureza; retângulo rósea destaca o sítio de glicosilação dos inibidores (Asn178-Ala179-Thr180); retângulo azul destaca o heptapeptídeo comum em inibidores de PLA<sub>2</sub> supostamente relacionado com mecanismo de ação; resíduos em vermelho destacam os aminoácidos diferentes ao inibidor de uma subespécie de *Crotalus durissus terrificus* (CNF).

### 4.3.2 Dicroísmo circular (CD)

#### 4.3.2.1 Análises de CD do inibidor

A **Figura 11** representa o espectro de CD do inibidor  $\gamma$ CdcPLI isolado do soro de *C. d. collilineatus*, em uma concentração da amostra de  $340 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .



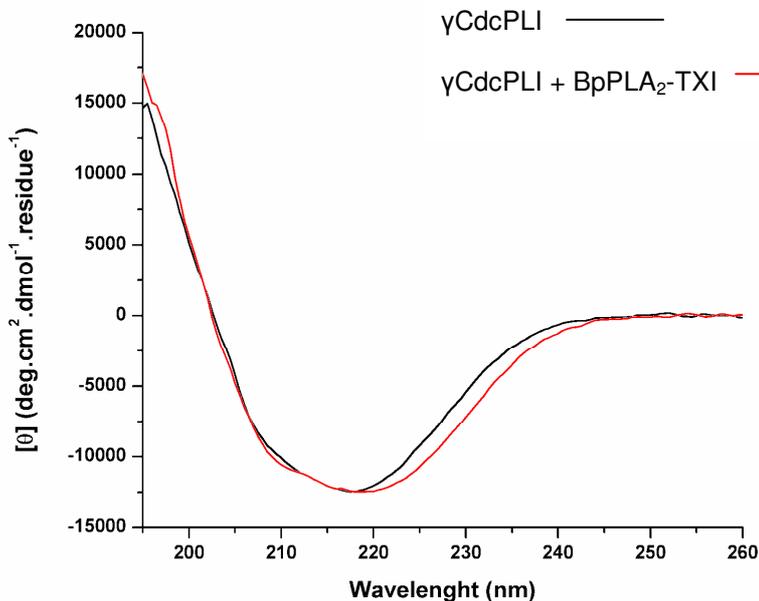
**Figura 11:** Espectro de Dicroísmo Circular do inibidor  $\gamma$ CdcPLI.

De acordo com os resultados e análises realizadas, o espectro obtido apresenta uma mistura de alfas-hélices e folhas beta pregueadas em sua estrutura secundária, com maior quantidade de folhas beta, por conta do valor mínimo de  $[\theta]$  obtido a 217 nm, mas com relativa incidência de alfas hélices por haver uma grande área da curva abaixo dos  $-8.500 [\theta]$  até por volta dos 208 nm, indicando uma mistura desses dois elementos de estrutura secundária. Isso pode ser verificado através da desconvolução da curva obtida, que mostrou a presença de aproximadamente 22% de alfas hélices e 29% de folhas beta.

#### 4.3.2.2 Complexo Inibidor – Enzima

O espectro de CD do  $\gamma$ CdcPLI, isolado do soro de *C. d. collilineatus* incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos com a BpPLA<sub>2</sub>-TXI ácida de *B. pauloensis* na

proporção 1:1 é demonstrado na **Figura 12**. A concentração total da amostra medida foi de  $700 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ .



**Figura 12:** Espectro obtido do Dicroísmo Circular mostrando o perfil do inibidor sozinho em preto ( $\gamma\text{CdcPLI}$ ) e o perfil do complexo inibidor/ $\text{PLA}_2$  ácida em vermelho ( $\gamma\text{CdcPLI} + \text{BpPLA}_2\text{-TXI}$ ).

Pode-se observar que a incubação do  $\gamma\text{CdcPLI}$  com a  $\text{BpPLA}_2\text{-TXI}$  ácida de *B. pauloensis* não provocou nenhuma mudança significativa na estrutura secundária do inibidor. A inibição da  $\text{BpPLA}_2\text{-TXI}$  ácida ocasionada pelo inibidor  $\gamma\text{CdcPLI}$  não resultou em sua modificação estrutural.

#### 4.3.3 Análises de espalhamento de luz dinâmico

Os resultados obtidos por esta técnica demonstraram que o inibidor possui uma tendência a oligomerização diante das condições experimentais avaliadas, tais como variação de temperatura ou quando o mesmo foi dissolvido em  $\text{H}_2\text{O}$  ou em PBS. O inibidor  $\gamma\text{CdcPLI}$  quando em  $\text{H}_2\text{O}$  apresentou aumento do número de monômeros na estrutura quaternária de acordo com o aumento da temperatura. Em  $4^\circ\text{C}$  ele se comportou como dímero e a temperatura de  $37^\circ\text{C}$  apresentou 32

monômeros. Nesta condição a massa molecular aproximada foi de 780 kDa (**Tabela 3**).

Os resultados dos ensaios de DLS em H<sub>2</sub>O, também demonstraram que o inibidor tem uma tendência a oligomerização em estequiometria par, com dímero, tetrâmero, octâmetro e assim por diante (**Tabela 3**). Em solução salina tamponada (PBS), o inibidor também apresentou tendência a oligomerização, porém de uma forma diferente quando em água, chegando a formar 14 monômeros a 37°C (**Tabela 4**). Estes resultados obtidos podem ser explicados por influência das condições delineadas para os experimentos.

**Tabela 3.** Dados de Espalhamento Dinâmico de Luz para  $\gamma$ CdcPLI, cujas medidas foram feitas com a amostra diluída em água.

T °C	R (nm)	MM (kDa)	Pd (%)	m (%)	Corformação oligomérica estimada
4 °C	3,1	46	0	99,8	Dímero
10 °C	4,1	93	18,3	98,7	Tetrâmero
18 °C	5,1	197	13,8	99,4	Octâmetro
25 °C	7,3	350	0	98,5	16 (monômeros)
32 °C	8,7	536	19,8	93	24 (monômeros)
37,5°C	10,2	780	18,2	95,7	32 (monômeros)

R = raio hidrodinâmico (nm); MM = massa molecular (kDa); Pd = polidispersividade (%); m = massa (%)

**Tabela 4.** Dados de Espalhamento Dinâmico de Luz para  $\gamma$ CdcPLI, cujas medidas foram feitas com a amostra diluída em tampão PBS 1x (150mM).

T °C	R (nm)	MM (kDa)	Pd (%)	M (%)	Corformação oligomérica estimada
4 °C	3	44	0	97,7	Dímero
10 °C	3,7	72	13,2	97	Trímero
18 °C	4,6	111	13,3	98	Pentâmero
25 °C	5,3	163	11,2	97,6	7x (monômeros)
32 °C	7	324	0	93,2	14x (monômeros)
37,5°C	7	321	18,3	96,3	14x (monômeros)

R = raio hidrodinâmico (nm); MM = massa molecular (kDa); Pd = polidispersividade (%); m = massa (%)

## 5.0 Discussão

Sabe-se da existência de inibidores de PLA<sub>2</sub> no sangue de diversas espécies de serpentes (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003; MARCUSSI *et al.*, 2007). A presença de inibidores nestes animais tem sido associado à resistência inata aos efeitos deletérios da peçonha (FAURE *et al.*, 2000), agindo como auto proteção contra as PLA<sub>2</sub> que poderiam alcançar o sistema circulatório (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003). Estes inibidores são classificados como  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  de acordo com suas diferenças estruturais (FORTES-DIAS, 2002; MARCUSSI *et al.*, 2007).

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização química, estrutural e funcional de um novo inibidor do tipo  $\gamma$  presente no soro de *Crotalus durissus collilineatus* (*Cdc*). Inicialmente foi avaliado o potencial inibitório do soro de *Cdc* sobre a atividade PLA<sub>2</sub> de diferentes peçonhas de serpentes (resultados não apresentados). De acordo com estes resultados obtidos foi confirmada a presença de inibidores de PLA<sub>2</sub> no soro de *Cdc*.

Para a purificação do inibidor utilizou-se uma cromatografia de troca-iônica em gel de Q-Sepharose Fast Flow, onde foram obtidas seis frações (Q1 a Q6) (**Figura 1**). Em seguida, a fração de interesse (Q4), foi submetida a uma nova cromatografia em coluna de afinidade como o já descrito por outros autores (LIZANO *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2003, OLIVEIRA *et al.*, 2008). Esta coluna foi previamente preparada pelo acoplamento a resina de uma PLA<sub>2</sub> PLA<sub>2</sub>-símile Lys49 BnSP-7 isolada da peçonha de *B. pauloensis* (RODRIGUES *et al.*, 1998 e SOARES *et al.*, 2000). Neste segundo passo cromatográfico obtivemos o inibidor de PLA<sub>2</sub>, denominado de  $\gamma$ CdcPLI (**Figura 3**), o qual representou 2,6% das proteínas totais presentes no soro de *Cdc* (**Tabela 1**). A combinação da técnica utilizada na obtenção do soro de *Cdc* e os passos cromatográficos escolhidos garantiram o bom rendimento apresentado. Em contrapartida, o rendimento na purificação de outros inibidores apresenta baixo rendimento como citado

brevemente por Santos-Filho (2012) na purificação de um inibidor do plasma de *Bothrops alternatus*.

Com o intuito de verificar a pureza e de se obter, essa proteína para prosseguir com os estudos de caracterização bioquímica, estrutural e funcional, as amostras do  $\gamma$ CdcPLI foram submetidas a cromatografias em HPLC-RP em coluna C4 (**Figura 4A**). Este procedimento preservou as características funcionais da proteína, visto que a inibição permaneceu inalterada. Diferentemente do inibidor CNF (FORTES-DIAS *et al.*, 1991) que perde a atividade após ser submetido à cromatografia em fase reversa.

A massa molecular do  $\gamma$ CdcPLI determinada por MALDI-TOF foi 22,34 kDa (**Figuras 5**). A diferença entre as massas moleculares determinadas por SDS-PAGE e espectrometria de massas pode ser explicada pela maior precisão dessa última técnica, refletindo melhor a massa molecular real da proteína. A massa molecular do  $\gamma$ CdcPLI determinada por MALDI-TOF está próxima à de alguns inibidores tipo  $\gamma$  já isolados, a saber: inibidor de PLA<sub>2</sub> CNF de *Crotalus durissus terrificus* (20,05 kDa), LNF1 (20,07 kDa) e LNF2 (20,05 kDa) de *Lachesis muta muta* (ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2008).

A estrutura primária do  $\gamma$ CdcPLI foi parcialmente determinada pelo sequenciamento de fragmentos obtidos pela digestão com a tripsina, utilizando o sequenciamento por degradação de Edman e por MS/MS (**Figura 8 e 9**). A sequência parcial demonstrou alta similaridade com outros inibidores do tipo  $\gamma$ . Sendo assim, foi possível determiná-lo como o primeiro inibidor de PLA<sub>2</sub> do tipo  $\gamma$  presente no soro de *Crotalus durissus collilineatus*.

Os inibidores do tipo  $\gamma$  encontrados na literatura demonstram sítios de N-glicosilação em sua estrutura primária. Geralmente este sítio de glicosilação é encontrado em asparaginas na sequência Asn-Xaa-Ser/Thr, sendo que Xaa é representado por qualquer aminoácido com exceção da Prolina (ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2008; SHIRAI *et al.*, 2009). Essa sequência foi encontrada no sequenciamento do  $\gamma$ CdcPLI, com a sequência **Asn-Ala-Thr** na posição 178, como destacado na **Figura 10** por um retângulo azul. Testes adicionais deverão ser realizados com o intuito de confirmar a presença deste sítio de glicosilação no inibidor.

Adicionalmente, em relação à estrutura primária, os inibidores tipo  $\gamma$  apresentam uma região comum responsável pelo reconhecimento de PLA<sub>2</sub>, o decapeptídeo (<sup>107</sup>PGLPLSLQNG<sup>116</sup>), o qual foi primeiramente observado na estrutura do P-PBIII isolado do plasma da serpente *Python reticulatus* (THWIN *et al.*, 2002). Parte desta sequência <sup>105</sup>PGEPLSK<sup>112</sup> também está presente na estrutura primária do  $\gamma$ CdcPLI, confirmando a identidade deste novo inibidor (**Figura 10**). A estrutura primária do  $\gamma$ CdcPLI também demonstrou alguns resíduos de aminoácidos diferentes quando comparados com a sequência do inibidor CNF isolado do plasma de *Crotalus durissus terrificus*. Os resíduos Ser22 e Glu107 em  $\gamma$ CdcPLI diferem do CNF por conter nesta posição resíduos de Cys e Phe nestas posições, possivelmente outras diferenças surgirão no sequenciamento completo deste inibidor.

Os estudos de dicroísmo circular revelaram que o inibidor  $\gamma$ CdcPLI, apresenta uma mistura de alfas-hélices (22%) e folhas beta (29%), verificado através da desconvolução da curva obtida (**Figura 11**). Este resultado corrobora a alta similaridade da estrutura primária entre os inibidores do tipo  $\gamma$ , considerando o padrão da estrutura secundária, com folhas- $\beta$  e alfa-hélice (ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2008). As análises de CD do complexo  $\gamma$ CdcPLI + BpPLA<sub>2</sub>-TXI revelaram nenhuma alteração na conformação da estrutura secundária das proteínas envolvidas (**Figura 12**), este resultado também foi verificado para diferentes classes de inibidores já isolados e estruturalmente caracterizados (OLIVEIRA *et al.*, 2008; SANTOS-FILHO *et al.*, 2011).

Os inibidores são conhecidos por formarem oligômeros com diferentes números de cadeias monoméricas, tendo relatos de inibidores do tipo  $\gamma$  com dois a seis monômeros em sua estrutura (OHKURA *et al.*, 1999; ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2008). O  $\gamma$ CdcPLI em estudos de espalhamento de luz dinâmico demonstrou um padrão de oligomerização deferente do que o até então é descrito na literatura, o que pode ser reflexo das condições experimentais (**Tabelas 3 e 4**). No entanto, novos experimentos utilizando outras técnicas biofísicas, tal como espalhamento de raios X a baixo ângulo deverão ser conduzidos para se obter a conformação oligomérica da proteína.

A massa molecular aparente determinada por estudo de DLS indicaram que na temperatura de 37°C a proteína apresentou uma massa molecular

aparente de 780 kDa em água e 321 kDa em PBS. Porém, atualmente os dados descritos na literatura indicam uma massa molecular variando de 90 a 130 kDa, compostos por 3-6 subunidades não covalentes (OHKURA *et al.*, 1999; ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2008). Novos testes deverão ser realizados para confirmação da massa da proteína nativa.

A capacidade inibitória do  **$\gamma$ CdcPLI** frente à diferentes PLA<sub>2</sub> reforçou uma característica marcante dos inibidores dessa classe. Estes apresentam um domínio responsável pelo reconhecimento da região de ligação do Ca<sup>2+</sup> de PLA<sub>2</sub>, independente da carga que a PLA<sub>2</sub> possua. Tal característica compartilhada pela classe garante o alto espectro de inibição em todos os grupos de PLA<sub>2</sub> (IA, IIA e IIIA) (DUNM, 2001).

Os estudos de inibição da atividade catalítica de PLA<sub>2</sub> foram conduzidos utilizando-se duas fosfolipases A<sub>2</sub>, sendo uma ácida (BpPLA<sub>2</sub>-TXI) e outra básica (BthTX-II), ambas Asp49. Pôde-se observar uma dose-dependência dos valores de inibição, com valores máximos de inibição na proporção 1:5 (PLA<sub>2</sub>: $\gamma$ CdcPLI, m/m) (**Tabela 2**). Estes resultados também sugerem que o inibidor  **$\gamma$ CdcPLI** é capaz de interagir com PLA<sub>2</sub>s Asp-49 ácidas ou básicas.

O  **$\gamma$ CdcPLI** também foi capaz de inibir a citotoxicidade sobre células tEnd e a miotoxicidade em músculo gastrocnêmio de camundongos induzidas pela PLA<sub>2</sub> Lys-49 BnSP-7, no entanto para as duas atividades a inibição não foi dose dependente (**Figuras 6 e 7**). Além disso, o inibidor demonstrou ser eficiente mesmo em pequenas razões, como 1:0,5 (BnSP-7:  $\gamma$ CdcPLI; m/m), com inibição significativa de aproximadamente 38%. Este dado sugere que deve haver uma razão molar ótima de interação entre a BnSP-7 e o inibidor  **$\gamma$ CdcPLI** que seja responsável pela inibição das atividades citotóxica e miotóxica, contudo ensaios adicionais devem ser conduzidos para confirmar essa hipótese.

Analisados em conjunto, aparentemente o inibidor  **$\gamma$ CdcPLI** apresenta melhor inibição sobre as atividades induzidas por PLA<sub>2</sub> Asp49 do que as induzidas por PLA<sub>2</sub> PLA<sub>2</sub>-símile Lys49, característica comum da classe dos inibidores  $\gamma$  como descrito por Oliveira *e colaboradores* (2011). Assim, o mecanismo de inibição pode estar relacionado a diferentes sítios na estrutura do inibidor que interajam de forma diferenciada para o sítio catalítico e os sítios citotóxicos e ou miotóxicos de PLA<sub>2</sub>s.

## 6.0 Conclusão

Neste trabalho foi isolado um novo inibidor de PLA<sub>2</sub> do tipo  $\gamma$  presente no soro de *Crotalus durissus collilineatus*, denominado  **$\gamma$ CdcPLI**. Esta proteína possui grande similaridade com outros inibidores já descritos e depositados em bancos de dados, em especial o CNF e o LNF1 e 2, com diferenças em alguns aminoácidos da cadeia polipeptídica. O  **$\gamma$ CdcPLI** demonstrou potencial inibitório frente diferentes atividades induzidas por PLA<sub>2</sub>, como enzimática, citotóxica e miotóxica. Dessa forma, estudos que demonstram os aspectos estruturais e funcionais de novos inibidores de PLA<sub>2</sub>s poderão fornecer subsídios para métodos alternativos na terapêutica do envenenamento ofídico ou no tratamento de desordens relacionadas à atividades de PLA<sub>2</sub>s.

## Referências

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A<sub>2</sub> – A structural review, **Toxicon**, v. 34, p. 827 – 841, 1996.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente crotálico. CARDOSO, J. L. C.; FRANCA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, V., editors. Animais Peçonhentos no Brasil. Biología, Clínica e Terapeutica dos Acidentes, **2nd edition Sao Paulo: Sarvier**, p. 108–15, 2009.

BON, C. Multicomponent neurotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. In: KINI, R. M., editor. Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: structure, function and mechanism. **Chichester: Wiley**, p. 269–85, 1997.

BON, C.; BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M. S.; LAMBEZAT, M. P. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin. **Act. Physiol.armacol. Latinoam.**, v. 39, p. 439–48, 1989.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL, Ministério da Saúde – Acidentes por animais peçonhentos - Serpentes. Disponível em:<[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_a rea=1539](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_a rea=1539)>. Acessado em: 05 abril 2013.

BUSSOLINO, F.; DE ROSSI, M.; SICA, A.; COLOTTA, F.; WANG, J. M.; BOCCHIETTO, E.; PADURA, I. M.; BOSIA, A.; DEJANA, E.; MANTOVANI, A.. Murine endothelioma cell lines transformed by polyoma middle T oncogene as target for and producers of cytokines. **J. Immunol**, v. 147, p. 2122–2129, 1991.

DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M Purification and properties of phospholipase A<sub>2</sub> from porcine pancreas. **Biochem. et Biophys. Acta: BBA**, v. 159, p. 103-117, 1968.

DENNIS, E. A. History, classification, structure and function of phospholipase A<sub>2</sub>. in UHL, W.; NEVALAINEN, T. J.; BÜCHLER, M. W. (eds): Phospholipase A<sub>2</sub>. Basic and Clinical Aspects in Inflammatory Diseases. **Prog Surg. Basel, Karger**, v. 24, p 1-7, 1997.

DOMONT, G. B.; PERALES, J.; MOUSSATCHE, H. Natural anti-snake venom proteins. **Toxicon.**, v. 29(10), p. 1183-94. 1991.

DUNM, K. W. B. Snake inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1533, p. 29-37, 2001.

ESTEVÃO-COSTA, M. I.; ROCHA, B. C.; MUDADO, M. A.; REDONDO, R.; FRANCO, G. R.; FORTES-DIAS, C. Prospection structural analysis and phylogenetic relationships of endogenous gamma-phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors in Brazilian *Bothrops* snakes (Viperidae, Crotalinae). **Toxicon**, v. 58, p. 122-9, 2008.

FAURE G.; VILLELA C.; PERALES J.; BON C., Interaction of the neurotoxic and non-toxic secretory phospholipases A<sub>2</sub> with the crotoxin inhibitor from *Crotalus* serum, **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 4799–4808, 2000.

FAURE, G. Natural inhibitors of toxic phospholipase A<sub>2</sub>. **Biochimie**, v. 82, p. 833-840, 2000.

FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F. A. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β-neurotoxin. **J. Mol. Biol.**, v. 412, p. 176-91, 2011.

FERREIRA, F. B. **Caracterização bioquímico-farmacológica de uma PLA<sub>2</sub> ácida isolada da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*)**. Dissertação de mestrado elaborada no Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

FORTES-DIAS, C. L. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipases A<sub>2</sub> in the blood plasma of snakes. **Toxicon**, v. 40, p. 481-4, 2002.

FORTES-DIAS, C. L.; FONSECA, B. C. B.; KOCHVA, E.; DINIZ, C. R., Purification and properties of an antivenom factor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v. 29, p. 99-1008, 1991.

FORTES-DIAS, C. L.; JANNOTTI, M. L. D.; FRANCO, F. J. L.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R. Studies on the specificity of CNF, a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor isolated from the blood plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Interaction with PLA<sub>2</sub> from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, v. 37, p. 1747-1759, 1999.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; CARLINI, C. R.; GUIMARAES, J. A. *Bothrops* sp. snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 119, p. 21-29, 1998.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: KINI, R.M. (Ed.). *Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function, and Mechanism*, **John Wiley and Sons**, England, p. 321-352, 1997.

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**, v. 26, p. 615-27, 1988.

INOUE, S.; KOGAKI, H.; IKEDA, K.; SAMEJIMA, Y.; OMORI-SATOH, T. Amino acid sequences of the two subunits of a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. Sequence homologies with pulmonary surfactant apoprotein and animal lectins. **Biol. Chem.**, v. 266, p. 1001-1007, 1991.

KIHARA, H. Studies on phospholipase A<sub>2</sub> in *Trimeresurus flavoviridis* venom. III. Purification and some properties of phospholipase A inhibitor in Habu serum, **J. Biochem.**, v. 80, p. 341-349, 1976.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v. 27, p. 613-635, 1989.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.

KINKAWA, K.; SHIRAI, R.; WATANABE, S.; TORIBA, M.; HAYASHI, K.; IKEDA, K.; INOUE, S. Up-regulation of the expressions of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors in the liver of a venomous snake by its own venom phospholipase A<sub>2</sub>. **Biochem. and Biophys. Res. Communications**, v. 395, p. 377-381, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins, during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-689, 1970.

LIZANO, S.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; FOX, J. W.; LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Two phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from the plasma of *Cerrophidion (Bothrops) godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. **Biochim. J.**, v. 346, p. 631-639, 2000.

LIZANO, S.; DUMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, p. 963-977, 2003.

MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C. D.; OLIVEIRA, C. Z.; RUEDA, A. Q.; MENALDO, D. L.; BELEBONI, R. O.; STABELI, R. G.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R.; SOARES, A. M. Snake venom phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 7, p. 743-56, 2007.

MASUDA, S.; MURAKAMI, M.; ISHIKAWA, Y.; ISHII, T.; KUDO, I. Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A<sub>2</sub> enzymes in several human tissues. **Biochim. et Biophys. Acta**, v. 1736, p. 200-210, 2005.

OHKURA, N.; KITAHARA, Y.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Isolation and amino acid sequence of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the blood plasma of the sea krait, *Laticauda semifasciata*. **J. Biochem.**, v. 125, p. 375-382, 1999.

OLIVEIRA, C. Z.; SANTOS-FILHO, N. A.; MENALDO, D. L.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; GIGLIO, J. R.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; RODRIGUES, F. H. S.; TASIC, L.; DA SILVA, S. L.; SOARES, A. M. Structural and Functional

Characterization of a  $\gamma$ -Type Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitor from *Bothrops jararacussu* Snake Plasma. **Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2509-2519, 2011.

OLIVEIRA, C. Z.; MENALDO, D. L.; MARCUSSI, S.; SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M. An  $\alpha$ -type phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: Structural and functional characterization. **Biochimie**, v. 90, p. 1506 a 1514, 2008.

OWNBY, C. L. Structure, function and biophysical aspects of aspects of myotoxins from snake venoms, **J. Toxicol.-Toxicon Reviews**, v. 17, p. 213-238, 1998.

OWNBY, C. L., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S., WHITE, S. P., FLETCHER, J. E., Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins, **Toxicon**, v. 37, p. 411-445, 1999.

PERALES, J.; DOMONT, G. B., Are inhibitors of metalloproteinases, phospholipases A<sub>2</sub> and myotoxins members of the innate immune system. In: A. Ménez, Editor, Perspectives. **Molecular Toxicology**, Wiley, Chichester, p.435-456, 2002.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCINI, A. C.; FONTES, M. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comp. Biochem. Physiol. a Mol. Integr. Physiol.**, v. 121, p. 215-22, 1998.

SALVADOR, G. H.; FERNANDES, C. A.; MAGRO, A. J.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; CAVALCANTE, W. L.; FERNANDEZ, R. M.; GALLACCI, M.; SOARES, A. M.; OLIVEIRA, C. L.; FONTES, M. R. Structural and phylogenetic studies with MjTX-I reveal a multi-oligomeric toxin--a novel feature in PLA<sub>2</sub> Lys49 protein class. **PLoS One**, v. 8, p. e60610, 2013.

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

SANTOS-FILHO, N. A.; FERNANDES, C. A. H.; MENALDO, D. L.; MAGRO, A. J.; FORTES-DIAS, C. L.; ESTEVÃO-COSTA, M. I.; FONTES, M. R. M.; SANTOS, C. R.; MURAKAMI, M. T.; SOARES, A. M. Molecular cloning and biochemical characterization of a myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake plasma. **Biochimie**, v. 93, p. 583-592, 2011.

SANTOS-FILHO, N. S. **Caracterização funcional e estrutural de um Inibidor de fosfolipase A<sub>2</sub> tipo- $\alpha$  de serpente *Bothrops alternatus*: Clonagem, expressão e mapeamento da região responsável pela atividade inibitória.** Tese de doutorado elaborada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2012.

SHIRAI, R.; TORIBA, M.; HAYASHI, K.; IKEDA, K.; INOUE, S. Identification and characterization of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from the serum of the Japanese rat snake, *Elaphe climacophora*. **Toxicon**, v. 53, p. 685-92, 2009.

SOARES, A. M.; GUERRA-AS, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 378, p. 201-9, 2000.

SOARES, A. M.; MARCUSSI, S.; STÁBELI, R. G.; FRANÇA, S. C.; GIGLIO, J. R.; WARD, R. J.; ARANTES, E. C. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. **BBRC.**, v. 302, p. 193-200, 2003.

THWIN, M. M.; SATISH, R. L.; CHAN, S. T. F.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Functional site of endogenous phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Python* serum. Phospholipase A<sub>2</sub> binding and anti-inflammatory activity. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, p. 719-727, 2002.

VITAL-BRAZIL, O. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking Action. **Mem Inst Butantan**, v. 33, p. 981–92, 1966.

WARRELL, D. A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. In: CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W., editors. The venomous reptiles of the Western Hemisphere. Ithaca and London: **Comstock Publishing Associates**, p. 709–61, 2004.

YEDGAR, S.; LICHTENBERG, D.; SCHNITZER, E. Inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> as a therapeutic target. **Biochim Biophys Acta**, v. 1488, 2000.