

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA-UNIR
NÚCLEO DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

AMY NICOLE GRABNER

BMAJ-II, UMA FOSFOLIPASE A₂ HOMÓLOGA BÁSICA DA PEÇONHA DA SERPENTE
Bothrops marajoensis COM POTENCIAL PARASITICIDA

PORTO VELHO-RO
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA-UNIR
NÚCLEO DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

BMAJ-II, UMA FOSFOLIPASE A₂ HOMÓLOGA BÁSICA DA PEÇONHA DA SERPENTE
Bothrops marajoensis COM POTENCIAL PARASITICIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Experimental como
requisito para obtenção de Título de Mestre

Orientada: Amy Nicole Grabner

Orientador: Leonardo de Azevedo Calderon

Co-Orientador: Andreimar Martins Soares

PORTO VELHO-RO
2016

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

Grabner, Amy Nicole.

G728b

Bmaj-II, uma fosfolipase A2 homóloga básica da peçonha da serpente *Bothrops marajoensis* com potencial parasiticida. / Amy Nicole Grabner, Porto Velho, 2016.

92f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo de Azevedo Calderon

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2016.

1. Peçonhas de serpentes. 2. Fosfolipase A2. 3. *Bothrops marajoensis*. 4. Leishmaniose I. Fundação Universidade Federal de Rondônia. II. Título.

CDU: 616.936

Bibliotecário responsável: Luã Silva Mendonça- CRB11/905

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aprovada em: 29 de fevereiro de 2016.

Banca Examinadora:

Membro Titular: Dr. Leonardo de Azevedo Calderon (FIOCRUZ-RO)

Membro Titular: Dr. Cristhian Collins Kuehn (Departamento de Medicina-UNIR)

Membro Titular: Dr. Antônio Coutinho Neto (Externo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Rondônia (UNIR) e todos os professores e docentes do Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental (PGBIOEXP), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas autorizações e suporte financeiro.

Aos membros da Banca Examinadora, Dr. Leonardo de Azevedo Calderon, Dr. Cristhian Collins Kuehn, Dr. Antônio Coutinho Neto, Dr. Andreimar Martins Soares e Dr. Anderson Makoto Kayano pela disponibilidade e atenção.

Ao meu orientador, Dr. Leonardo de Azevedo Calderon, e meu co-orientador, Dr. Andreimar Martins Soares, pelo conhecimento e orientação ao longo do meu projeto.

Aos meus amigos e colegas do Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde, CEBio-UNIR/FIOCRUZ-RO. Obrigado pela paciência, constante apoio e ajuda, por tudo que me ensinaram e pela amizade.

Aos colaboradores do Laboratório da Plataforma Técnica RPT11G de Bioensaios de Malária e Leishmaniose, FIOCRUZ, especialmente a Dra. Carolina Bioni Garcia e todos seus discentes. Obrigado pela agilidade e por serem dispostos a gastar seu tempo e recursos para me ajudar obter resultados tão importantes ao meu trabalho.

Aos membros do *Centro de Desarrollo para la Investigación Científica*, Asunción, Paraguai, especialmente ao Mr. Jorge Alfonso e Mrs. Ana Gomez pela colaboração com testes antiparasitários e pela grande amizade.

Aos pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural UNESP, especialmente ao Mr. Fábio Florença Cardoso pela colaboração nos experimentos de caracterização estrutural.

Ao meu melhor amigo e marido, Fernando, por me incentivar, me alegrar, e me ajudar a vencer os desafios em todos os momentos difíceis. Sem você essa conquista seria impossível.

Aos meus pais por me providenciar as melhores oportunidades de ensino e educação desde pequena. Obrigado por nunca me deixarem desistir e por me darem confiança em mim mesma durante minha vida toda.

A todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente de alguma forma a fazer acontecer este trabalho.

RESUMO

Amy Nicole Grabner. BMAJ-II, UMA FOSFOLIPASE A₂ HOMÓLOGA BÁSICA DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops marajoensis* COM POTENCIAL PARASITICIDA

Peçonhas de serpentes contêm várias proteínas que apresentam potencial para serem aplicadas em diversas áreas da saúde e medicina. Uma classe de toxina que vem sendo objeto de estudo, são as fosfolipases A₂ (PLA₂s), as quais têm importante participação no envenenamento ofídico, estando associadas a diversas respostas tais como processo inflamatório, miotoxicidade, cardiotoxicidade, hemólise e outros que ocorrem em acidentes ofídicos. Além disso, componentes de peçonhas de serpentes, tais como as L-aminoácido oxidases e PLA₂s, demonstram potencial antiparasitário, podendo ser úteis para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas nessa área. O presente trabalho teve como objetivo a purificação, caracterização bioquímica e biológica de uma nova PLA₂ básica de *Bothrops marajoensis* com potencial atividade parasiticida. A peçonha foi fracionada aplicando duas etapas cromatográficas iniciando por troca iônica utilizando uma resina CM Sepharose em pH 8,0. A fração de interesse foi selecionada para as etapas seguintes baseada em sua massa molecular e tempo de retenção, e submetida a cromatografia de fase reversa em coluna C18. Realizou-se análise por SDS-PAGE da toxina isolada nomeada Bmaj-II, uma análise eletroforética bidimensional, o sequenciamento parcial de seus aminoácidos, um ensaio de atividade enzimática, uma investigação das estruturas secundárias por dicroísmo circular e ensaios de espalhamento de luz dinâmico. Em seguida, o potencial anti-parasitário da peçonha de *B. marajoensis* e de Bmaj-II foi avaliado contra promastigotas de *Leishmania infantum* e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi in vitro* em concentrações de 6,25 a 100 µg/mL, e contra formas intraeritrocíticas de *Plasmodium falciparum* em concentrações entre 0,09 e 12,5 µg/mL. Posteriormente, a atividade citotóxica sobre células hospedeiras HepG2 foi avaliada. A Bmaj-II mostrou-se homogênea com uma massa molecular confirmada por espectrometria de massa MALDI-TOF² de 13.956 Da. Apresentou-se um pI de 9,68 indicando compatibilidade de massa e pI de PLA₂s de peçonhas de serpentes (svPLA₂) básicas. Os resultados dos demais ensaios de caracterização estrutural sugerem a Bmaj-II como PLA₂ homóloga Lys49 com uma alta tendência de formar agregações. A toxina isolada demonstrou significativa atividade antiparasitária contra todos os protozoários, contra *L. infantum* e *T. cruzi* aproximadamente 30% em concentração de 100 µg/mL, sendo observado também, uma atividade substancialmente maior da peçonha, entre 60-80% em concentração de 100 µg/mL. A atividade da peçonha e da Bmaj-II contra *P. falciparum* apresentou IC₅₀ de 0,14 ± 0,08 e 6,41 ± 0,64 µg/mL, respectivamente, com valores de CC₅₀ de citotoxicidade contra células HepG2 de 43,64 ± 7,94 e 53,07 µg/mL, respectivamente. Os resultados obtidos mostram o isolamento da Bmaj-II, uma PLA₂ Lys49 inédita da peçonha de *Bothrops marajoensis* além de evidenciar sua atividade microbicida sobre *L. infantum*, *T. cruzi*, e *P. falciparum*. O estudo do seu potencial biotecnológico em relação à leishmaniose, a doença de Chagas e a malária deve ser aprofundado.

Palavras chave: Peçonhas de serpentes, Fosfolipase A₂, *Bothrops marajoensis*, leishmaniose, doença de Chagas, malária.

ABSTRACT

Amy Nicole Grabner. BMAJ-II, A BASIC PHOSPHOLIPASE A₂ HOMOLOGUE FROM *Bothrops marajoensis* SNAKE VENOM WITH PARASITICIDAL POTENTIAL

Snake venoms contain various proteins which present potential applications in diverse areas of health and medicine. One class of toxins that has been the object of study, is that of phospholipases A₂ (PLA₂s), which play an important role in envenomings and are associated with several responses such as the inflammatory process, myotoxicity, cardiotoxicity, hemolysis and others that occur in snake bite accidents. Furthermore, snake venom components, such as L-amino acid oxidases and PLA₂s, demonstrate anti-parasitic potential and may be useful for the development of alternative treatments in this area. This study had as its objective the purification, biochemical and biological characterization of a new basic PLA₂ from *Bothrops marajoensis* with potential parasiticidal activity. The venom was fractionated through two chromatographic steps, beginning with cation exchange using a CM Sepharose resin at a pH of 8.0. The fraction of interest was selected for the following chromatographic steps based on its molecular mass and retention time, and was subjected to reverse phase chromatography in a C18 column. SDS-PAGE analysis of the isolated toxin Bmaj-II was performed, followed by two-dimensional electrophoresis, partial amino acid sequencing, an enzymatic activity assay, an investigation of the secondary structures through circular dichroism, and dynamic light scattering assays. After that, the *in vitro* anti-parasitic potential of *B. marajoensis* venom and of Bmaj-II was evaluated against *Leishmania infantum* promastigotes and *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, at concentrations from 6.25 to 100 µg/mL, and intraerythrocytic forms of *Plasmodium falciparum* at concentrations between 0.09 and 12.5 µg/mL. Later, cytotoxic activity against HepG2 cells was evaluated. Bmaj-II was shown to be homogeneous with a molecular mass confirmed by MALDI-TOF² mass spectrometry of 13,956 Da. It presented a pI of 9.68 indicating mass and pI compatibility with other basic snake venom PLA₂s (svPLA₂). The results of the other structural characterization tests suggest that Bmaj-II is a Lys49 PLA₂ homologue with tendency to form aggregations. The isolated toxin showed significant anti-parasitic activity against all protozoa, approximately 30% at a concentration of 100 µg/mL, and the venom showed substantially greater activity, between 60-80% at a concentration of 100 µg/mL against *L. infantum* and *T. cruzi*. Activity of the venom and of Bmaj-II against *P. falciparum* presented IC₅₀ of 0.14 ± 0.08 and 6,41 ± 0,64 µg/mL, respectively, with CC₅₀ values for cytotoxicity against HepG2 cells of 43,64 ± 7,94 and 53.07 µg/mL, respectively. The results obtained present the isolation of Bmaj-II, an unpublished Lys49 PLA₂ from *Bothrops marajoensis* venom, besides this toxin's microbicidal activity against *L. infantum*, *T. cruzi*, and *P. falciparum*. Its biotechnological potential in relation to leishmaniasis, Chagas disease and malaria should be more deeply investigated.

Keywords: Snake venoms, Phospholipase A₂, *Bothrops marajoensis*, leishmaniasis, Chagas disease, malaria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Incidência de acidentes ofídicos por região do Brasil de 2001 a 2012.....	13
Figura 2: Espécime de <i>Bothrops marajoensis</i> e sua distribuição geográfica.....	15
Figura 3: Estruturas tridimensionais de fosfolipases dos grupos IA, IB e II.....	17
Figura 4: Especificidade de hidrólise de ligações ésteres das fosfolipases.....	18
Figura 5: Mecanismo de ação de uma fosfolipase A ₂	18
Figura 6: Distribuição geográfica mundial e no Brasil da leishmaniose.....	21
Figura 7: Distribuição geográfica mundial da doença de Chagas.....	24
Figura 8: Casos de malária por 1000 pessoas na América do Sul em 2014.....	26
Figura 9: Perfil cromatográfico da peçonha de <i>Bothrops marajoensis</i> utilizando resina de troca catiônica.....	45
Figura 10: Eletroforese monodimensional das frações cromatográficas da peçonha de <i>B. marajoensis</i> em resina de troca iônica.....	46
Figura 11: Perfis cromatográficos de fase reversa.....	47
Figura 12: Eletroforese monodimensional da PLA ₂ isolada e da peçonha de <i>B. marajoensis</i>	48
Figura 13: Eletroforese bidimensional (2D) da PLA ₂ isolada.....	49
Figura 14: Espectro de massa em AXIMA TOF ² da PLA ₂ isolada.....	50
Figura 15: Dicroísmo circular da Bmaj-II.....	51
Figura 16: Sequência parcial da Bmaj-II e seu alinhamento múltiplo.....	53
Figura 17: Similaridade da sequência parcial de Bmaj-II e as PLA ₂ s do alinhamento múltiplo.....	53
Figura 18: Sequência parcial da Bmaj-II e outras PLA ₂ s conhecidas da peçonha de <i>B. marajoensis</i>	54
Figura 19: Similaridade da sequência parcial de Bmaj-II e as outras PLA ₂ s conhecidas da peçonha de <i>B. marajoensis</i>	54
Figura 20: Atividade fosfolipásica da peçonha e Bmaj-II de <i>B. marajoensis</i>	55
Figura 21: Atividade da peçonha e Bmaj-II de <i>B. marajoensis</i> contra <i>L. infantum</i>	57
Figura 22: Atividade da peçonha e Bmaj-II de <i>B. marajoensis</i> contra <i>T. cruzi</i>	57
Figura 23: Atividade antimalárica da peçonha e Bmaj-II de <i>B. marajoensis</i>	58
Figura 24: Atividade citotóxica da peçonha e Bmaj-II de <i>B. marajoensis</i>	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fisiopatologia causada por peçonhas de serpentes botrópicas.....	14
Tabela 2: Atividade antiparasitária de peçonhas de serpentes e suas PLA ₂ s contra <i>Leishmania spp</i>	31
Tabela 3: Atividade antiparasitária de peçonhas de serpentes e suas PLA ₂ s contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
Tabela 4: Atividade antiparasitária de peçonhas de serpentes e suas PLA ₂ s contra <i>Plasmodium falciparum</i>	33
Tabela 5: Bmaj-II em forma dimérica em AMBIC 50 mM pH 9 (1 mg/mL após centrifugação e filtração).....	52
Tabela 6: Bmaj-II em forma tetramérica em AMBIC 50 mM pH 9 (2 mg/mL após centrifugação).....	52
Tabela 7: IC ₅₀ , CC ₅₀ e índice de seletividade da peçonha de <i>B. marajoensis</i> e da Bmaj-II contra <i>P. falciparum</i> e células HepG2.....	58
Tabela 8: Comparação de estratégia de purificação, massa molecular, pI e atividade enzimática de PLA ₂ s isoladas da peçonha da serpente <i>B. marajoensis</i>	61
Tabela 9: Grau de similaridade entre as sequências de PLA ₂ s Lys49 ou Asp49 comparado com a sequência parcial de Bmaj-II.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrila

AMBIC: Bicarbonato de Amônio

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

Bmaj-9: Fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *B. marajoensis*

Bmaj-II: Fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *B. marajoensis*

Bmar: Fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *B. marajoensis*

BmjeTX-I: Fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *B. marajoensis*

BmjeTX-II: Fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *B. marajoensis*

BSA: *Bovine Serum Albumin*

BthTX-I: Fosfolipase A₂ homóloga isolada da peçonha de *B. jararacussu*

CDC: *Center for Disease Control and Prevention*

CPRG: Chlorophenol Red-β-D-galactoside

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTT: Ditioneitol

ESI-IT-TOF: Electrospray-Ion Trap-Time of Flight

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

LIT: *Liver Infusion Tryptose*

MALDI-TOF: *Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight*

MjTX-II: Fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *B. moojeni*

MM: Padrão de massa molecular

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

Mtx-II: Fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *B. asper*

Myo-II: Miotoxina da peçonha de *B. diporus*

pI: Ponto isoelétrico

PLA₂: Fosfolipase A₂

PrTX-I: Fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *B. pirajai*

PrTX-II: Fosfolipase A₂ homóloga isolada da peçonha de *B. pirajai*

SBF: Soro Fetal Bovino

SDS-PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Sódio Dodecil Sulfato

svPLA₂: Fosfolipase A₂ de veneno de serpente

TFA: Ácido trifluoracético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 ACIDENTE OFÍDICO.....	12
1.2 PEÇONHAS BOTRÓPICAS.....	13
1.3 <i>Bothrops marajoensis</i>	15
1.4 FOSFOLIPASES A ₂ (PLA ₂) DA PEÇONHA DE SERPENTES	16
1.5 LEISHMANIOSE.....	20
1.6 DOENÇA DE CHAGAS.....	23
1.7 MALÁRIA.....	25
1.8 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE FOSFOLIPASES DE PEÇONHAS DE SERPENTES.....	28
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA PLA ₂ BÁSICA DA PEÇONHA DA SERPENTE <i>Bothrops marajoensis</i>	35
3.1.1 Peçonha e autorização.....	35
3.1.2 Cromatografia de troca iônica.....	35
3.1.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	35
3.1.4 Dosagem de proteínas utilizando o método Lowry.....	36
3.1.5 Cromatografia de fase reversa.....	36
3.1.6 Determinação da massa molecular.....	37
3.1.7 Determinação do ponto isoelétrico.....	37
3.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE Bmaj-II.....	38
3.2.1 Dicroísmo circular.....	38
3.2.2 Espalhamento de luz dinâmico.....	38
3.2.3 Sequenciamento N-terminal.....	39
3.2.4 Digestão trípica e espectrometria de massa dos peptídeos.....	39
3.2.5 Identificação da toxina por PEAKS.....	40

3.2.6 Estudo de similaridade	40
3.3 ENSAIO DE ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA.....	40
3.4 CARACTERIZAÇÃO ANTIPARASITÁRIA DE Bmaj-II.....	41
3.4.1 Atividade antipromastigota <i>in vitro</i> contra <i>Leishmania infantum</i> , MCAN/ES/92/BNC83.....	41
3.4.2 Atividade antiepipimastigota <i>in vitro</i> contra <i>Trypanosoma cruzi</i> , Cepa CL-B5.....	41
3.4.3 Atividade antimalárica <i>in vitro</i> contra <i>Plasmodium falciparum</i>	42
3.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	43
3.5.1 Atividade citotóxica contra células hepáticas, HepG2.....	43
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	44
4 RESULTADOS	45
4.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA PLA ₂ BÁSICA DA PEÇONHA DA SERPENTE <i>B. marajoensis</i>	45
4.1.1 Isolamento da PLA ₂	45
4.1.2 Determinação do ponto isoelétrico.....	49
4.1.3 Determinação da massa molecular.....	50
4.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE Bmaj-II.....	51
4.2.1 Dicroísmo circular.....	51
4.2.2 Espalhamento de luz dinâmico.....	52
4.2.3 Determinação da estrutura primária e estudos de similaridade.....	52
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA.....	55
4.4 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL.....	56
4.4.1 Avaliação de atividade antiparasitária.....	56
4.4.2 Avaliação de atividade citotóxica.....	56
5 DISCUSSÃO.....	60
5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA PLA ₂ BÁSICA DA PEÇONHA DA SERPENTE <i>B. marajoensis</i>	60
5.2 CARATERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	65
5.3 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL.....	67
6 CONCLUSÃO.....	74
7 REFERÊNCIAS	75
8 APÊNDICES.....	89
9 ANEXOS.....	93
9.1 AUTORIZAÇÃO DE ACESSO DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO.....	93

1 INTRODUÇÃO

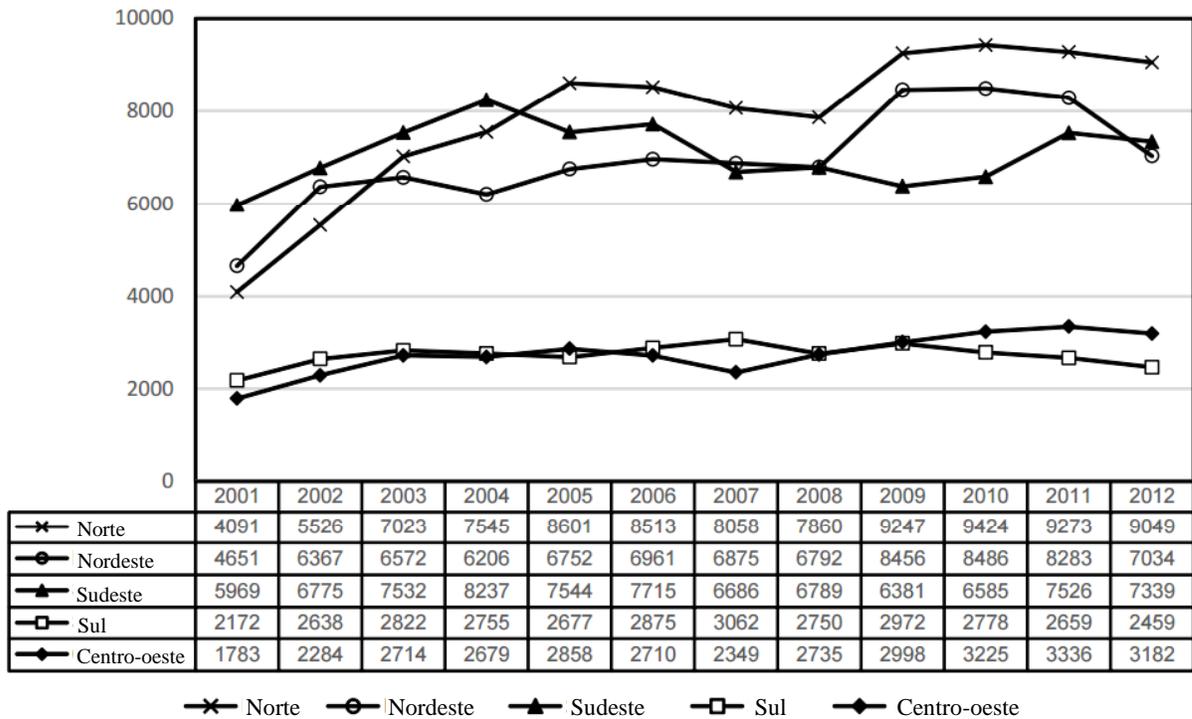
1.1 ACIDENTE OFÍDICO

Os animais peçonhentos estão espalhados por toda a Terra e abrangem cerca de 100.000 espécies, incluindo répteis, peixes, anfíbios, mamíferos, aracnídeos, entre outras. Por causa dessa distribuição mundial e devido aos graves transtornos que provoca no indivíduo acometido, o envenenamento constitui-se em um problema de saúde pública de grande relevância, muito embora tenha sido sistematicamente negligenciado pelas autoridades de saúde em muitas partes do mundo (CALVETE, 2009). Ainda neste contexto, o acidente ofídico, responsável por cerca de 80% das mortes mundiais causadas por envenenamento, foi reconhecido em 2009 como uma condição tropical negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (CALVETE, 2009; WILLIAMS, 2010; WHO, 2014c).

De acordo com a OMS até fevereiro de 2015, aproximadamente 2,5 milhões de pessoas por ano são vítimas do envenenamento ofídicos, resultando em cerca de 300.000 amputações e 100.000 mortes. Essa condição afeta mais intensamente trabalhadores agrícolas e crianças, especialmente em regiões de países de baixa renda com difícil acesso aos recursos médicos (WHO, 2015c).

Na América do Sul, o Brasil é o país com o maior número de acidentes ofídicos (cerca de 20.000 casos por ano, com a maior incidência na região Norte) (**Figura 1**), seguido pelo Peru (4.500), Venezuela (2.500 a 3.000), Colômbia (2.675), Equador (1.200 a 1.400) e Argentina (1.150 a 1.250) (ARAÚJO et al., 2003; BRASIL, 2008). Vários levantamentos epidemiológicos mostram que os acidentes ofídicos ocorrem no Brasil mais frequentemente no local de trabalho e nas épocas chuvosas (ARAÚJO et al., 2003; BRASIL, 2008).

Estudos epidemiológicos mostram que os acidentes ofídicos apresentam taxas de mortalidade de cinco a seis vezes maiores quando comparadas com algumas das doenças tropicais mais bem pesquisadas como a dengue e a cólera (WILLIAMS, 2010). Uma das razões para estes elevados índices é a limitação da distribuição, armazenamento, e especificidade das opções de tratamento existentes atualmente para o envenenamento ofídico (WHO, 2014c).

Figura 1: Incidência de acidentes ofídicos por região do Brasil de 2001 a 2012

Incidência de acidentes ofídicos entre o anos de 2001 e 2012, por região do Brasil: norte, nordeste, sudeste, sul, e centro-oeste.

ADAPTADO DE: BOCHNER; FISZON; MACHADO, 2014

1.2 PEÇONHAS BOTRÓPICAS

São descritas 366 espécies de serpentes no Brasil, sendo um dos países com a maior herpetofauna. Estas serpentes estão distribuídas em 10 famílias: Anomalepididae (6 espécies), Leptotyphlopidae (14), Typhlopidae (6), Aniliidae (1), Tropidophiidae (1), Boidae (12), Colubridae (34), Dipsadidae (237), Elapidae (27) e Viperidae (28), sendo estas duas últimas consideradas peçonhentas (BERNARDE, 2011).

Como parte da endemia mundial de acidentes ofídicos, estima-se que no Brasil, cerca de 20.000 acidentes por ano estão associados às serpentes da família Viperidae (PORTO et al., 2007).

Dentro desta família, os gêneros *Bothrops* e *Lachesis*, caracterizados pela presença de fosseta loreal e órgão termorregulador localizado entre o olho e a narina, são responsáveis por mais de 90% dos acidentes de envenenamento ofídico no Brasil (FELICORI; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI; SÁNCHEZ, 2005; BRASIL, 2008).

A elevada incidência de acidentes ofídicos tem sido atribuída ao grande número de espécies, à sua ampla distribuição geográfica e agressividade, bem como a um aparelho inoculador de peçonha altamente eficaz (GALBIATTI et al., 2012), o que conduz para uma taxa de letalidade de 0,31% e 0,95%, respectivamente associadas aos acidentes botrópicos e laquéticos (BERNARDE, 2011). De fato, as serpentes do gênero *Bothrops*, devido às características anteriormente listadas, são responsáveis pela maior morbidade humana do que qualquer outro grupo de serpentes peçonhentas no hemisfério ocidental (KOHLHOFF et al., 2012).

O envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* é caracterizado por efeitos locais pronunciados incluindo hemorragia, edema, dor e mionecrose, bem como efeitos sistêmicos, como coagulopatias e insuficiência renal aguda (CAVALCANTE et al., 2011) (**Tabela 1**). Algumas das manifestações clínicas de acidentes botrópicos incluem as manifestações locais que ocorrem nas primeiras horas após a mordida e manifestações sistêmicas como sangramentos internos e externos (BRASIL, 2008).

Tabela 1: Fisiopatologia causada por peçonhas de serpentes botrópicas

Ações da peçonha	Manifestações locais	Manifestações sistêmicas
Proteolítica local	Edema intenso	Coagulopatia
Hemorrágica	Equimose e bolhas	Insuficiência Renal Aguda
Nefrotóxica	Sangramentos	
	Infecções secundárias	
	Gangrena	
	Síndrome compartimental	

Tabela adaptada de SANTOS; FARANI; ROCHA, 2009

As peçonhas botrópicas demonstram-se bioquimicamente complexas, com moléculas variadas, incluindo carboidratos, minerais, enzimas, peptídeos e componentes proteicos. Estas proteínas que compõem a peçonha de serpente podem incluir, mas não são limitadas, às serinoproteases, metaloproteases, L-aminoácido oxidases, lectinas tipo-C, miotoxinas, acetilcolinesterases, disintegrinas, e PLA₂s do grupo II. Esses componentes individuais podem exibir uma série de ações que resultam nos efeitos tóxicos nas vítimas de envenenamento, tais como, miotoxicidade, neurotoxicidade, e efeitos farmacológicos, como atividade antitumoral e

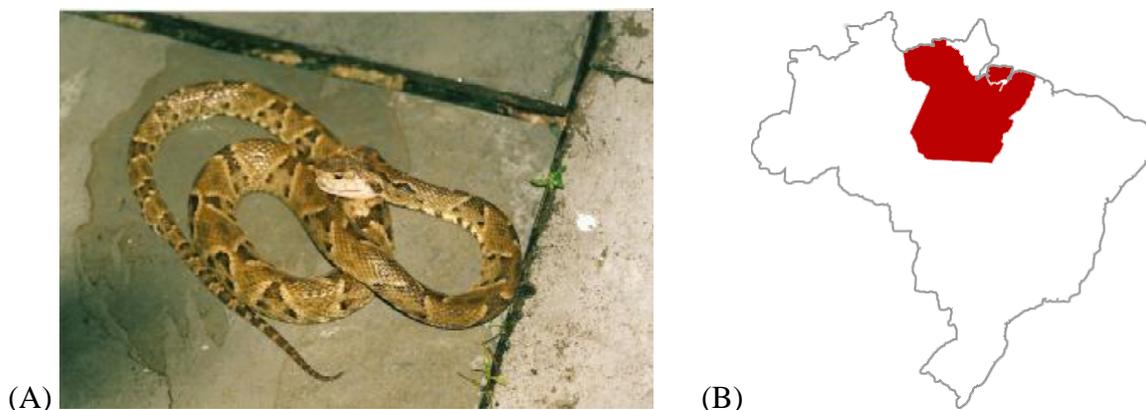
antimicrobiana (CALVETE, 2007; MARQUES-PORTO; LEBRUN; PIMENTA, 2008; CALDERON et al., 2014).

A maior compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos acidentes ofídicos é condição importante para que o desenvolvimento de tratamentos mais seguros e eficazes, fazendo com que a erradicação de mortes por envenenamento seja possível (GUTIÉRREZ et al., 2009). Neste contexto, a caracterização proteômica de peçonhas de serpentes é uma ferramenta importante, com diversos benefícios potenciais para a pesquisa básica, diagnóstico clínico, e desenvolvimento de novas aplicações de pesquisa e fármacos com potencial uso clínico. Esses estudos podem ter implicações não só no tratamento de acidentes ofídicos, mas em outras doenças (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007).

1.3 *Bothrops marajoensis*

A serpente *Bothrops marajoensis* (nome comum: Jararaca-marajoara) é encontrada nas savanas da Ilha de Marajó que se localiza no Rio Amazonas, no estado do Pará, e é considerada uma espécie endêmica do Brasil (BERNARDE, 2011; CAVALCANTE et al., 2011) (**Figura 2**). Serpente de médio porte (150 cm), vive em habitat terrestre, alimentando-se de anfíbios, lagartos e pequenos mamíferos (CAMPOS, 2014).

Figura 2: Espécime de *Bothrops marajoensis* e sua distribuição geográfica



A) Foto de um espécime da serpente *Bothrops marajoensis*. **B)** Distribuição geográfica da serpente *B. marajoensis* no estado do Pará, Brasil.

FONTE: CAMPOS et al., 2014

De acordo com Cavalcante e colaboradores (2011), esta espécie faz parte do complexo “*Bothrops atrox*” que compõem uma série de populações de jararacas distribuídas pelas zonas tropicais da América Central a do Sul, e uma caracterização toxinológica das peçonhas de serpentes deste complexo tem uma importância particular para o diagnóstico clínico e a produção de antiveneno eficaz, bem como para uma melhor compreensão das relações entre as espécies botrópicas.

As proteínas da peçonha de *B. marajoensis* ainda são pouco estudadas. Estes estudos incluem a caracterização biológica da peçonha (CAVALCANTE et al., 2011); uma investigação dos efeitos antibacterianos e antiparasíticos de uma PLA₂ Lys49 Bmar isolada da peçonha (COSTA TORRES et al., 2010); a caracterização biológica da PLA₂ Asp49 Bmaj-9 isolada da peçonha (GALBIATTI et al., 2012); atividade neurotóxica, miotóxica e citolítica das PLA₂s Asp49 BmjeTX-I e BmjeTX-II (PONCE-SOTO et al., 2010); e os efeitos renais e cardiovasculares da peçonha e uma PLA₂ isolada (EVANGELISTA et al., 2010).

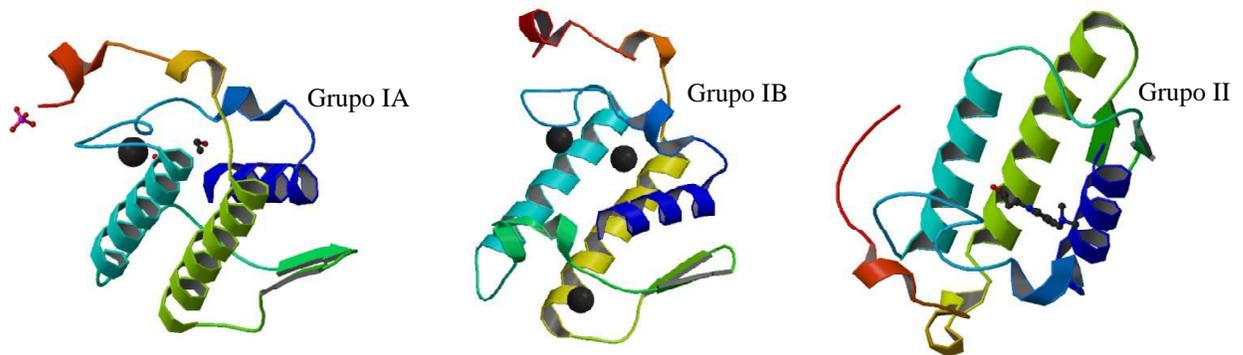
Além dessas fosfolipases, também foram descritas outras proteínas isoladas dessa peçonha, inclusive L-aminoácido oxidases (LAAO), metaloproteases, e serinoproteases. As LAAOs estudadas induzem hemorragia, hemólise, edema, nefrotoxicidade, citotoxicidade, e atividade microbicida contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, e formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis* (COSTA TORRES et al., 2010; DANTAS et al., 2015). A metaloprotease isolada da peçonha de *B. marajoensis* é chamada BmHF-1, a qual apresenta atividade caseinólítica, edema, e pouca atividade hemorrágica (TORRES-HUACO et al., 2010). Algumas serinoproteases tipo trombina, inclusive batroxobinas e TLBm, têm papéis importantes na coagulação de fibrogênio e na ativação do fator plasmático XIII (WALTER et al., 1977; VILCA-QUISPE et al., 2010).

1.4 FOSFOLIPASES A₂ (PLA₂s) DA PEÇONHA DE SERPENTES

É essencial que as características estruturais e funcionais dos componentes da peçonha dessas serpentes sejam definidas. As PLA₂s são as únicas atualmente descritas em peçonhas de serpentes e podem ser classificadas em 15 grupos de acordo com sua função e estrutura, incluindo 4 principais tipos: sPLA₂ (secretada), cPLA₂ (citossólica), iPLA₂ (independente de cálcio), e fator ativador de plaquetas (PAF). As PLA₂s provenientes de serpentes do gênero *Bothrops* são

classificadas como sPLA₂s do grupo II, que diferem em suas pontes dissulfeto comparado com PLA₂s de outras serpentes, classificadas como sPLA₂s do grupo I (DENNIS; BURKE, 2009) (**Figura 3**).

Figura 3: Estruturas tridimensionais de fosfolipases dos grupos IA, IB e II

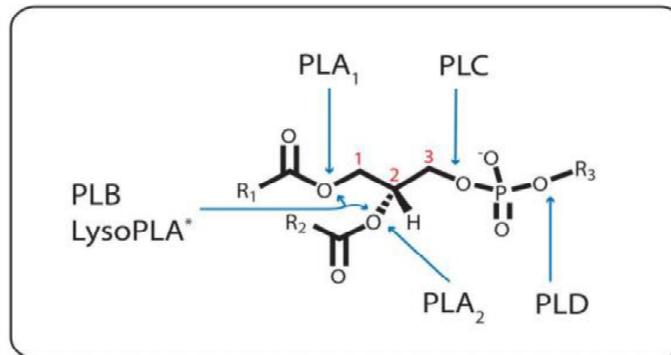


Estruturas tridimensionais de fosfolipases do grupo IA da peçonha de *Naja naja sagittifera*, do grupo IB do pâncreas porcino de *Sus scrofa*, e do grupo II da peçonha de *Daboia russelii*. Apesar que as sequências de aminoácidos entre os grupos sejam diferentes, há algumas estruturas comuns entre todas as fosfolipases A₂ dos grupos I e II, inclusive duas alfa-hélices e duas asas de beta-folhas. As pontes dissulfetos únicas em cada fosfolipase incluem: Cys11-Cys77 nos grupos IA e IB, e Cys50-Cys134 no grupo II. Essas estruturas tridimensionais são altamente conservadas entre as fosfolipases do mesmo grupo (MACKESSY, 2010).

Imagens de JABEEN et al., 2005; PAN e BAHNSON, 2010; SHUKLA et al., 2012, respectivamente.

Uma vez que os fosfolípeos estão presentes em todos os organismos vivos como componentes de membranas celulares, as enzimas que clivam essas moléculas, como fosfolipases, são também amplamente distribuídas na natureza. As fosfolipases são compostas de dois grupos de acordo com o tipo de clivagem em um fosfolípido: as hidrolases de acilos (PLA₁, PLA₂, PLB, e LysoPLA) e as fosfodiesterases (PLC e PLD) (**Figura 4**). Todas as PLA₂s catalisam a hidrólise da ligação *sn*-2-acila de glicerofosfolípidos em uma forma dependente de cálcio produzindo os ácidos graxos livres e lisofosfolípidos (**Figura 5**). Porém, suas funções fisiológicas, modo de ação, e regulação variam muito (COGO, 2006; ALOULOU et al., 2012).

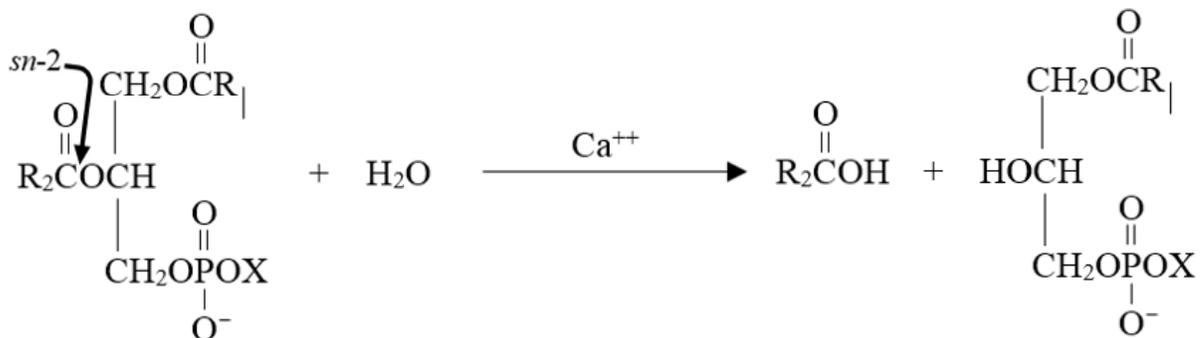
Figura 4: Especificidade de hidrólise de ligações ésteres das fosfolipases



As PLA₁, PLA₂, e PLC catalisam a hidrólise da ligação éster do *sn*-1 (1), *sn*-2 (2), e *sn*-3 (3) de um fosfolípido, respectivamente. A PLD hidrolisa a ligação fosfodiéster. A PLB cliva ambas as ligações ésteres *sn*-1 e *sn*-2. *A LysoPLA pode clivar ou a ligação éster *sn*-1 ou a *sn*-2 ou ambas. R₁, R₂, e R₃ representam grupos variados.

Fonte: RICHMOND; SMITH, 2011

Figura 5: Mecanismo de ação de uma fosfolipase A₂



Uma fosfolipase catalisando a hidrólise da ligação *sn*-2-acilada de um glicerofosfolípido em uma forma dependente de cálcio produzindo um ácido graxo livre e lisofosfolípido. Imagem adaptada de DENNIS et al. 1981

A presença de isoformas de PLA₂s já foi comprovada na mesma peçonha de serpentes ou em peçonhas de outras espécies do mesmo gênero, e apesar da semelhança bioquímica entre essas isoformas, diferenças são encontradas em suas atividades farmacológicas e enzimáticas (PONCE-SOTO et al., 2010). A existência da diversidade de proteínas da mesma família na mesma peçonha de serpente, mas que diferem em seus efeitos farmacológicos, representa uma evolução darwinista que provavelmente desenvolveu-se devido os numerosos organismos que uma serpente possa tentar vitimar (CALVETE, 2009).

As PLA₂s encontradas em peçonhas de serpentes podem ser subdivididas principalmente em Asp49 e Lys49. No primeiro grupo é notável a capacidade de degradação enzimática de fosfolipídeos, enquanto que, no segundo, esta atividade apresenta-se de forma residual ou nula. De qualquer forma, ambas exibem diversas atividades biológicas tais como, neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade e hemólise (FLORIANO et al., 2013; HELENO et al., 2013). Além disso, podem induzir edema, o qual pode ser aumentado por causa da degradação enzimática de fosfolipídeos (CHAVES, 1998).

As PLA₂s miotóxicas são importantes, pois são ferramentas relevantes para o estudo dos mecanismos-chaves da inflamação. De fato, os níveis elevados de PLA₂s secretadas (sPLA₂s) são detectados em numerosas doenças inflamatórias em seres humanos, tais como asma brônquica, rinite alérgica, choque séptico, pancreatite aguda, queimadura extensa, doenças auto-imunes, artrite reumatoide, doenças inflamatórias do intestino e aterosclerose. Os mecanismos envolvidos na ação pró-inflamatória de sPLA₂s estão sendo ativamente investigados, e a maior parte deste conhecimento é baseada em estudos usando PLA₂s purificadas de peçonhas animais (CARREGARI; FLORIANO; RODRIGUES-SIMIONI, 2013).

Vários estudos focando nas funções biológicas de PLA₂s têm descoberto informações essenciais em direção ao desenvolvimento de terapias biológicas contra algumas das doenças listadas anteriormente. Utilizando inibidores de PLA₂s encontrados em macrófagos humanos, desenvolveu-se novas opções de tratamentos contra artrite reumatoide, inflamação e erosão óssea (DAVIGNON et al., 2013). Diversos trabalhos investigaram o uso de PLA₂s em tratamentos antitumorais, encontrando algumas que matam células tumorais através de citotoxicidade, e outras que bloqueiam adesão e migração celular inibindo o desenvolvimento de tumores (ZOUARI-KESSENTINI et al., 2013). Ainda, outras pesquisas estudaram mais detalhadamente as PLA₂s envolvidas em transtornos neurológicos como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, a esclerose múltipla, a epilepsia, entre outros. Através de uma atenção específica a essas PLA₂s e seus inibidores, os autores conseguiram desenvolver um tratamento que, em ensaios em modelos murinos, mostrou a eficácia em reduzir transtornos neurológicos (CALON et al., 2004; FAROOQUI; ONG; HORROCKS, 2006).

Neste contexto, a purificação e a caracterização de uma nova PLA₂ da peçonha de *B. marajoensis* pode ser uma ferramenta importante para a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da mesma, assim como ser implicada em possíveis aplicações biotecnológicas.

1.5 LEISHMANIOSE

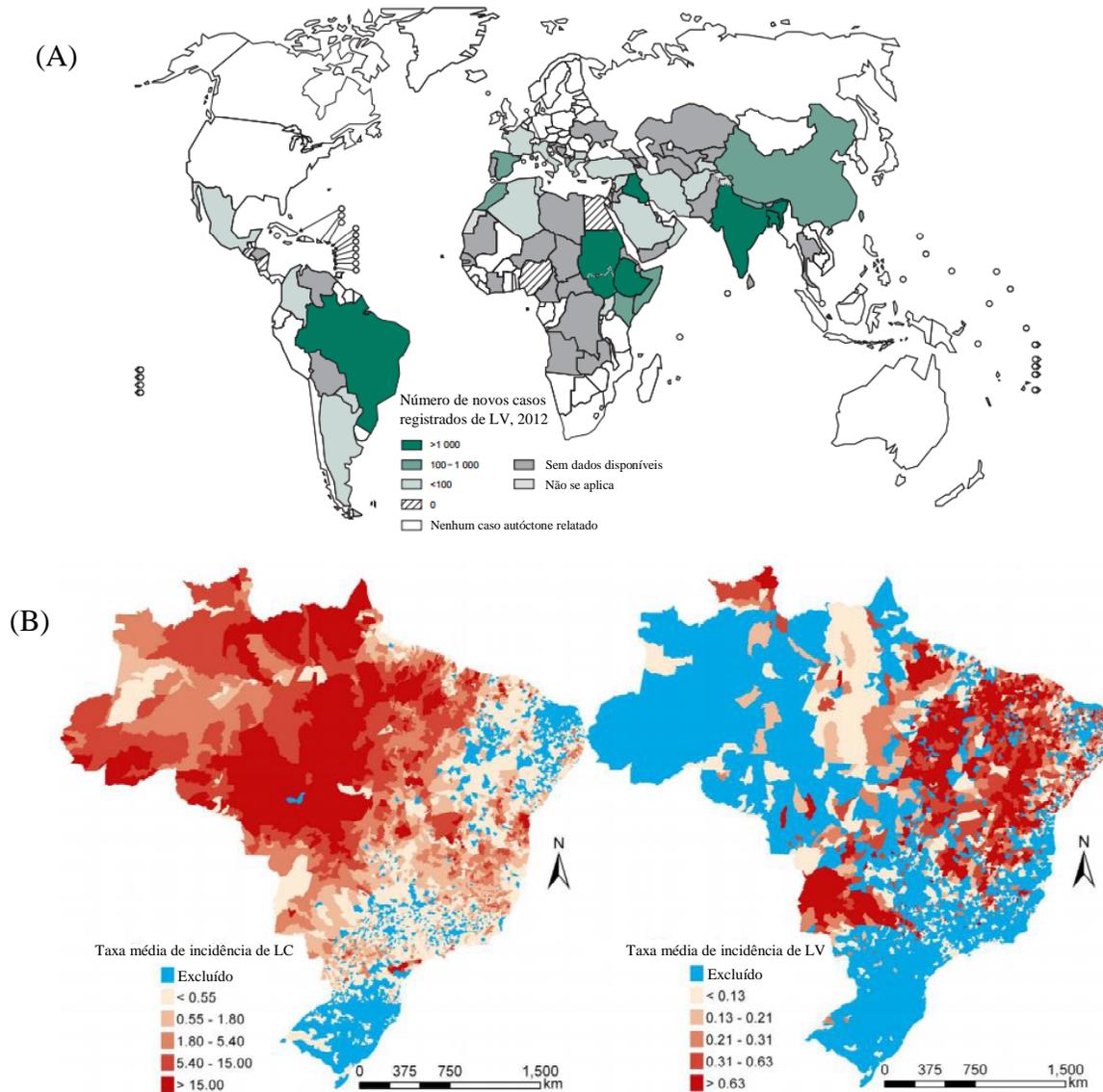
Além dos acidentes ofídicos, há outras doenças tropicais que necessitam de estudos, tendo como objetivo, entre outros, criar alternativas terapêuticas, com drogas mais eficientes e com menos efeitos colaterais tóxicos do que os tratamentos atuais. Uma dessas doenças causada por protozoários parasitários é a Leishmaniose. A fisiopatologia associada a este parasita tem sido bem estudada, porém ainda não está recebendo atenção de maneira satisfatória pelas indústrias farmacêuticas (REITHINGER et al., 2007). Por ainda ser considerada uma doença negligenciada há um número maior de vítimas da leishmaniose do que deveria haver, se investimentos maiores fossem empregados no seu estudo (WHO, 2014b).

Incontestavelmente, as 1.300.000 pessoas infectadas todo ano com algum tipo de leishmaniose e 310.000.000 pessoas em risco de serem infectadas, merecem uma atenção maior da comunidade contra essa doença devastadora (WHO, 2014b). A leishmaniose é prevalente em 98 países e 3 territórios em 5 continentes (**Figura 6A**), com mais de 90% dos casos ocorrendo em apenas 6 países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, e Sudão. O estimado número de mortes anualmente causadas por leishmaniose são de 20.000 a 50.000 (WHO, 2015b). Entre os anos 1990 e 2013, mais de 600.000 casos clínicos de leishmaniose foram registrados no Brasil, a maioria devido à leishmaniose cutânea com aproximadamente 10% devido à leishmaniose visceral. A leishmaniose cutânea mostra uma incidência maior na região norte do país, enquanto a leishmaniose visceral é mais prevalente no nordeste e centro-oeste (**Figura 6B**) (KARAGIANNIS-VOULES et al., 2013).

Essa patologia é transmitida pelo vetor flebotomíneo, da subfamília Phlebotominae, geralmente do gênero *Lutzomyia*. Quando um flebotomíneo se alimenta de sangue humano, o protozoário é inoculado na forma flagelada, no homem chamado promastigota metacíclico. O parasita é rapidamente fagocitado por macrófagos do hospedeiro e é envolvido por um fagolisossomo onde é convertido na forma amastigota, sem flagelo, por causa do seu mecanismo de evasão contra os processos de degradação realizados nos macrófagos. Esses protozoários se multiplicam nas células dos tecidos onde os macrófagos estão localizados, tais como tecidos cardíacos, digestivos, ou nervosos, entre outros. Depois de um tempo, os macrófagos são lisados e as amastigotas infectam outros macrófagos, possivelmente em outros tecidos hospedeiros. Quando um outro flebotomíneo suga o sangue de um hospedeiro infectado, ingere amastigotas da

Leishmania spp. seguido por um outro ciclo dentro do vetor até chegar na saliva para infectar um outro hospedeiro em potencial. O desenvolvimento de novos tratamentos contra leishmaniose deveria considerar como alvo as formas infectantes do parasita citadas anteriormente (KIERSZENBAUM, 1999; REITHINGER et al., 2007; ABADIR et al., 2010).

Figura 6: Distribuição geográfica mundial e no Brasil da leishmaniose



Distribuição geográfica mundial de leishmaniose visceral (LV) baseado em casos relatados em 2012 (A) e incidência de leishmaniose cutânea (LC) (esquerda) e leishmaniose visceral (direita) por 10.000 pessoas durante 2001-2010 no Brasil (B). Os locais em azul foram excluídos por falta de dados completos.

Gráficos adaptados de: WHO, 2015b; KARAGIANNIS-VOULES et al., 2013

Há cinco tipos de manifestações da doença em humanos – a leishmaniose visceral, a leishmaniose tegumentar/cutânea, a leishmaniose mucosa, a leishmaniose mucocutânea, e a leishmaniose cutânea difusa (ADADE et al., 2014; RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014). Os quadros clínicos desses tipos da leishmaniose podem variar de acordo com áreas geográficas, diferentes espécies de *Leishmania* e a resposta do hospedeiro (READY, 2014).

A leishmaniose visceral é causada pelas espécies *Leishmania infantum/L. chagasi*, *L. donovani* (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013). Pode ter apresentações clínicas variadas desde a forma assintomática até o quadro clássico da doença caracterizado por febre, anemia, hepatoesplenomegalia, hemorragia, linfadenomegalia, perda de peso, taquicardia, tosse seca, diarreia, e desnutrição. Essa forma da leishmaniose pode levar a óbito em 2-3 anos (PASTORINO et al., 2002; GOMES et al., 2004).

A leishmaniose tegumentar, na maioria dos casos é causada pelo parasita da espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* mas há registros de manifestações da leishmaniose tegumentar sendo causada pelas seguintes espécies também: *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) guyanensis*, *L.(V.) panamensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L.(V.) colombiensis*, *L.(V.) lindenbergi*, *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (L.) pifanoi*, *L.(L.) amazonensis*, *L. (L.) garnhami*, *L.(L.) venezuelensis*, *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica* (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). É caracterizada por úlceras cutâneas rasas com bordas elevadas e bem definidas no ponto de inoculação de parasitas promastigotas metacíclicos. A lesão tipicamente começa como uma pápula eritematosa, que pode ser vista a partir de alguns dias a vários meses, após a inoculação inicial do parasita. Esta, posteriormente, avança para uma úlcera do qual pode curar sozinha entre 3 a 15 meses depois do surgimento. Em alguns casos, o tratamento é necessário para acelerar o processo da cura (ABADIR et al., 2010). Uma variação clínica da leishmaniose tegumentar é a leishmaniose mucocutânea, caracterizada por nódulos e ulceração geralmente em membros inferiores. Se não for tratado, pode desenvolver-se em leishmaniose mucosa, o qual apresenta lesões mucosas, principalmente no nariz e/ou na boca (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; GOMES et al., 2004).

Essa doença endêmica em regiões equatoriais, tem tratamentos incluindo antimônios pentavalentes, como estibogluconato de sódio, desoxicolato de anfotericina B, anfotericina B lipossomal, pentamidina, miltefosina, entre outros. O medicamento utilizado como primeira escolha no Brasil é o antimoniato de metilglucamina. Apesar que esse tratamento é eficaz contra as formas diferentes da leishmaniose, por causa da grande quantidade excretada pelos rins, faz-se

necessário um regime de aplicações diárias durante um longo período, o qual pode levar à falta de término de tratamento. Nenhum dos tratamentos disponíveis para a leishmaniose atualmente é ideal por causa de seus altos custos, efeitos colaterais tóxicos, falta de eficácia e de acesso em certas regiões, além da resistência do parasita. Mesmo depois de tratamento, no caso da leishmaniose visceral, pode se desenvolver em outras formas de leishmaniose cutânea (RATH et al., 2003; WHO, 2015b).

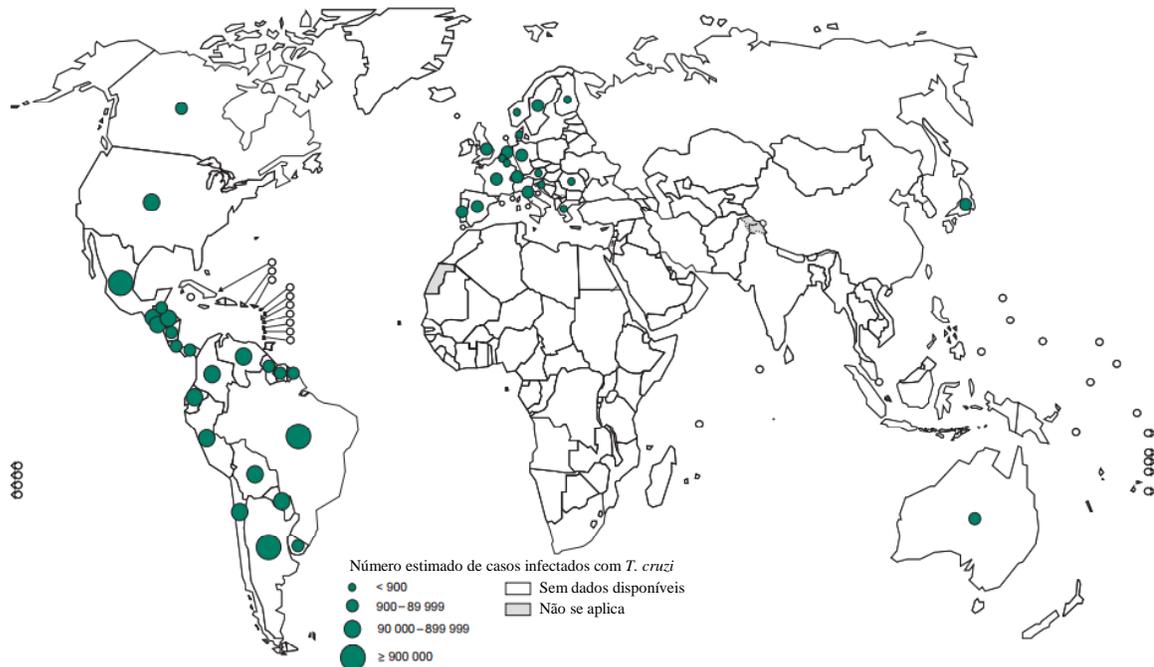
De maneira geral, essas limitações de tratamento podem ter consequências sérias, pois o tratamento das manifestações clínicas é obrigatório, sob pena de progressão e prognóstico graves (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; SAVOIA, 2015). Especificamente a leishmaniose cutânea, embora possa-se curar espontaneamente, em alguns casos o tratamento é necessário (CDC, 2013a). A leishmaniose é geralmente fatal dentro de 2 anos de infecção se deixar de tratá-la (WHO, 2015b).

1.6 DOENÇA DE CHAGAS

Outra doença negligenciada que capta a atenção da comunidade científica é a doença de Chagas. Trata-se de uma doença potencialmente fatal, provocada pelo parasita protozoário *Trypanosoma cruzi* e constitui-se um grave problema de saúde em regiões endêmicas da América Latina (TIMM et al., 2014). O parasita pode entrar no organismo de um hospedeiro humano através do consumo de alimentos contaminados por *T. cruzi*, transfusões de sangue de doadores infectados, infecção congênita, transplantes de órgãos, acidentes laboratoriais, ou de forma vetorial (WHO, 2014a).

Cerca de 8 milhões de pessoas no mundo são portadoras da doença e destas, aproximadamente 3 milhões no Brasil (**Figura 7**). Devido à inexistência de uma vacina disponível no mercado, e apesar dos esforços para controle do vetor triatomíneo, novos casos são diagnosticados anualmente (BRASIL, 2014; WHO, 2014a). Até 30% e 10% das pessoas infectadas desenvolvem alterações cardíacas e digestivas ou neurológicas, respectivamente, que podem levar à morte depois de muitos anos (WHO, 2014a). É estimado que a doença de Chagas causa 10.000 mortes anualmente, sendo considerada a causa principal de mortes na população idosa no Brasil (CHATELAIN, 2015).

Figura 7: Distribuição geográfica mundial da doença de Chagas



Distribuição geográfica mundial da doença de Chagas baseado em casos relatados em 2012.

Gráfico adaptado de: WHO, 2015b

No Brasil há mais de 152 espécies de triatomíneos, o vetor da doença, inclusive alguns principais: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* que ao se alimentar do sangue do hospedeiro, defeca em região muito próxima ao local da picada. Uma reação inflamatória se instala no local da picada provocando intensa coceira. Ao coçar, cria uma via de entrada pelo qual as fezes contendo o parasita em forma tripomastigota metacíclico entram no organismo do hospedeiro. Os macrófagos encontram o parasita e o fagocitam, mas ele tem um mecanismo de escape dos vacúolos por meio de enzimas expressas em sua superfície, liberando-o do processo de degradação pelo sistema imune (MAUEL, 1984; KELLY, 2003). O parasita invade células hospedeiras no sítio de inoculação e evolui para a forma replicativa, amastigota. As amastigotas se multiplicam dentro das células e diferenciam-se em tripomastigotas. Nessa forma, são liberadas na corrente sanguínea para invadir outras células do mesmo tecido ou de tecidos diferentes. Quando um outro barbeiro suga o sangue desse hospedeiro infectado, o parasita é ingerido e o barbeiro se torna um vetor da doença, capaz de infectar outras pessoas no futuro (CDC, 2010).

Após o momento de infecção com o parasita, o hospedeiro entra na fase aguda da doença. Mais de 99% dos casos agudos da doença de Chagas são assintomáticos ou apresentam sintomas não específicos como febre e dispnéia; porém há 5-10% de mortalidade entre os pacientes na fase aguda que não recebem tratamento (TEIXEIRA et al., 1978; BASTOS et al., 2010). Depois de um determinado tempo, geralmente 1-2 meses, o paciente entra a fase crônica da doença, o qual na maioria dos casos é assintomática. Alguns pacientes desenvolvem as formas mais graves da doença, inclusive a forma cardíaca e a digestiva. O desenvolvimento dessas formas fatais da doença pode ser dependente da resposta imune inicial do paciente na fase aguda, entre outros fatores (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014).

Atualmente, apenas uma forma de tratamento é considerada eficaz, empregada rotineiramente e está baseada em dois nitroderivados: o benzonidazol (Bz) e nifurtimox (Nf). Embora o tratamento tenha uma elevada eficácia em eliminar o parasita no início da fase aguda, com o progresso da doença, sua capacidade em eliminar o protozoário diminui substancialmente (TIMM et al., 2014). Essas drogas utilizadas na quimioterapia também mostram vários efeitos colaterais, inclusive dermatite alérgica, prurido, febre, intolerância gastrointestinal, entre outros, destacando a urgência para o desenvolvimento de tratamentos alternativos da doença de Chagas (CHATELAIN, 2015). Além disso, seu alto custo é um dos motivos pelo qual a doença de Chagas seja uma doença negligenciada com altos índices em pessoas de baixa renda (PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2014). Neste contexto, o desenvolvimento de novas drogas que sejam seguras, eficazes e de baixo custo são extremamente necessárias (WHO, 2014a; CHATELAIN, 2015).

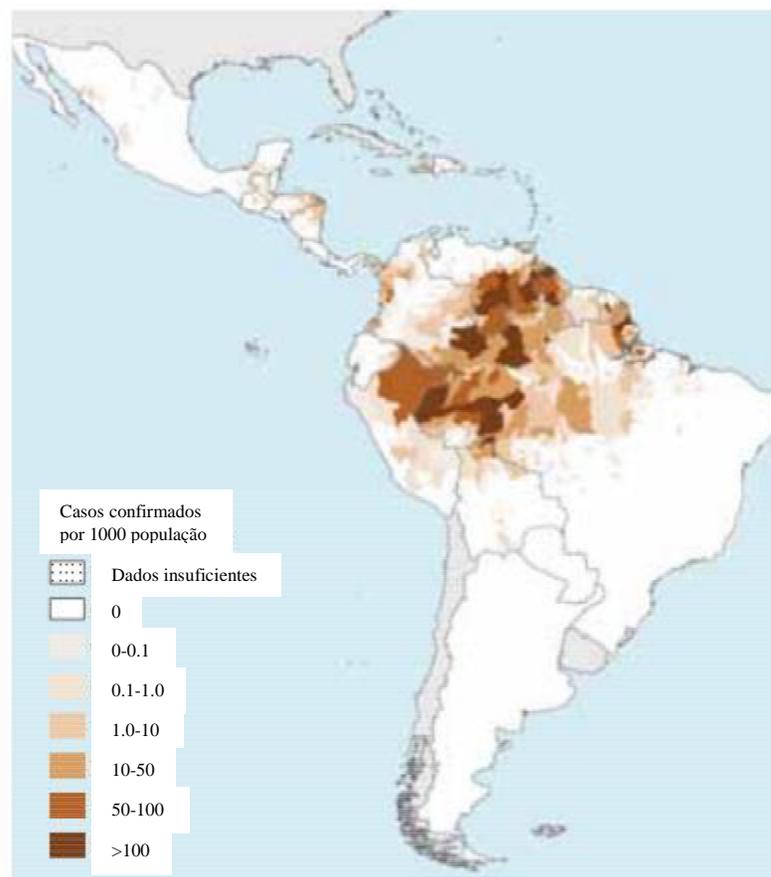
Além dos tratamentos pós-infecção, uma outra abordagem para o controle da transmissão da doença está baseada no controle do vetor e triagem nos bancos de sangue. Porém, devido aos elevados custos em manter tais programas, bem como a existência de reservatórios animais, associadas à falta de quimioterapia adequada, a erradicação da doença de Chagas ainda é um objetivo pouco plausível (RODRÍGUEZ-MORALES et al., 2015).

1.7 MALÁRIA

A malária é uma das principais doenças parasitárias relevantes em áreas tropicais do mundo, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, cinco dos quais são capazes de infectar o ser humano, os primeiros três sendo encontrados nas Américas: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P.*

malariae, *P. ovale*, e o mais recentemente identificado *P. knowlesi* (SINGH et al., 2004). Felizmente, a comunidade internacional tem investido muito no controle, prevenção, diagnóstico e tratamento de malária durante as últimas duas décadas, levando a uma declinação substancial na transmissão de malária. Porém, ainda constitui a doença hemoparasítica mais comum do mundo (WESOLOWSKI et al., 2015; QUIÑONES et al., 2015).

Figura 8: Casos de malária por 1000 pessoas na América do Sul em 2014



Distribuição geográfica da malária na América do Sul medida por casos confirmados por 1000 pessoas em 2014.

Gráfico adaptado de: WHO, 2015d

No ano 2000, a OMS criou um plano de 15 anos chamado *Millenium Development Goals* para combater a malária mundialmente. Apesar que essas metas foram alcançadas e o risco, casos, e mortalidade associados com a malária têm diminuído muito, ainda há muito a melhorar.

Atualmente, há aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas em risco de contrair a malária, sendo que em 2015, houve 214 milhões de novos casos e 438.000 mortes. Na América do Sul, o número de casos de malária diminuiu de 1,2 milhões em 2000 a 390.000 em 2014, apresentado por região na **Figura 8**. Destes, o Brasil foi o país com a maior incidência da região, representando 37% dos casos, e quase a metade das 79 mortes relatadas, com a maior ocorrência no estado de Amazonas (WHO, 2015d).

A malária tem dois hospedeiros: o vertebrado e a mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. Quando um mosquito infectado com *Plasmodium spp.* pica um ser humano, esporozoítos são inoculados pelo vetor e migram pelo sangue do hospedeiro para as células Kupffer, células hepáticas humanas. No ciclo exo-eritrocítico que ocorre no fígado, o parasita replica-se dentro de hepatócitos que eventualmente são rompidos liberando parasitas na forma de merozoítos. Os merozoítos infectam as células vermelhas do sangue, começando o ciclo eritrocítico, quando aparecem os sintomas no hospedeiro. No ciclo eritrocítico, o parasita se multiplica mais uma vez, primeiro formando trofozoítos jovens e depois esquizontes. Os esquizontes são rompidos deixando o parasita em forma de merozoíto livre para infectar outros eritócitos, repetindo o ciclo eritrocítico. Em algum momento, os trofozoítos imaturos podem se diferenciar em gametócitos masculinos e femininos dentro dos glóbulos vermelhos do humano. Se um mosquito do gênero *Anopheles* picar um humano com células vermelhas infectadas com gametócitos do parasita *Plasmodium spp.*, o mosquito se torna vetor da doença, podendo infectar outros humanos quando suga seu sangue no futuro (MILLER et al., 1973; SICILIANO e ALANO, 2015; CDC, 2015).

Entre 8 e 30 dias depois da picada do mosquito infectado com o *Plasmodium spp.*, podem aparecer os primeiros sintomas da malária. Os mesmos são variáveis e parecidos com infecção viral, inclusive: dor de cabeça, cansaço, fadiga, desconforto abdominal, dores musculares e articulares, febre, calafrios, tremores, sudorese, anorexia, vômito, diarreia, dor abdominal, falta de apetite e mal-estar geral (FIOCRUZ, 2013). Se for detectado nessa fase aguda, e tratamentos apropriados forem administrados, uma recuperação completa é geralmente vista. Porém, se tratamento for adiado ou um tratamento de mal qualidade for administrado, o paciente frequentemente pode desenvolver malária severa afetando os órgãos do infectado. Os sintomas da malária grave podem incluir: coma (malária cerebral), acidose metabólica, anemia grave, hipoglicemia, insuficiência renal aguda ou edema pulmonar agudo, e em muitos casos é fatal (DEL PRADO et al., 2014; WHO, 2015a).

Os tratamentos antimaláricos atualmente utilizados variam de acordo com a espécie de *Plasmodium* envolvida, evolução de resistência às drogas, a severidade do quadro clínico, e até a região geográfica em alguns casos (CDC, 2013b). Por causa da resistência de muitas cepas de *Plasmodium* às drogas antimaláricas, a OMS recomenda terapia em combinação baseada em artemisinina (ACT) para a maioria dos casos de malária causados por *P. falciparum*, inclusive os seguintes pares de remédios: artemeter/lumefantrina, artesunato/amodiaquina, artesunato/mefloquina, diidroartemisinina/piperaquina, artesunato/pironaridina e artesunato/sulfadoxina-pirimetamina. Enquanto esses ACTs podem ser eficazes contra outras espécies de *Plasmodium*, Cloroquina/primaquina permanece no tratamento de primeira linha para a cura radical da espécie *P. vivax* na maioria das regiões (CUI et al., 2015). A prevenção da malária inclui uso de repelentes e inseticidas; porém resistência do vetor a esses, assim como a resistência do parasita às terapias antimaláricas têm levado a comunidade científica a explorar alternativas, tais como uma vacina ou novos tratamentos. Esses esforços até agora tiveram pouco sucesso (LONGLEY; HILL; SPENCER, 2015).

1.8 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE PEÇONHAS DE SERPENTES E FOSFOLIPASES A₂

Considerando que a doença de Chagas, a Leishmaniose e a malária afetam milhões de pessoas ao redor do mundo, há uma grande necessidade de mecanismos de prevenção e tratamento destas graves patologias. Apesar de haver tratamentos para essas doenças, os mesmos não são ideais por não serem totalmente eficazes e apresentarem efeitos colaterais (GONÇALVEZ et al., 2002).

Tradicionalmente, as peçonhas de animais foram usadas no tratamento de algumas condições fisiopatológicas e com o progresso da Biotecnologia e ciências ómicas e melhores técnicas de purificação de componentes dessas peçonhas, os usos terapêuticos de algumas destas condições têm progredido (ADADE et al., 2011). Depois do desenvolvimento do anti-hipertensivo Captopril, diversas pesquisas científicas vêm investigando o potencial de peçonhas de serpentes e seus componentes como tratamentos em potencial contra uma diversidade de doenças, porém, com relativamente pouco sucesso (CUSHMAN et al., 1977; HARVEY, 2014).

Os resultados de alguns estudos que foram realizados em relação a peçonhas de serpentes, suas PLA₂s e seus efeitos contra *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp.*, e *Plasmodium falciparum* estão apresentados nas **Tabelas 2, 3, e 4**, respectivamente. Compara-se as formas morfológicas dos parasitas, assim como o grau de atividade antiparasitária de espécies e gêneros diferentes de serpentes.

Alguns desses estudos investigaram os possíveis mecanismos e moléculas da peçonha responsáveis pelo efeito antiparasitário. Castillo-Vigil e colaboradores (2008) avaliaram o mecanismo de ação da atividade tripanocida da peçonha de *B. asper*. Foi descoberto que a morte dos parasitas aconteceu por meio da combinação de necrose e apoptose, provavelmente causado principalmente pelas ações das PLA₂s da peçonha, devido ao comprometimento da integridade da membrana celular. Adade e colaboradores (2011) demonstraram que a utilização de *para*-bromophenacyl-bromide (*p*-BPB), um inibidor de PLA₂s causou uma inibição parcial da atividade tripanocida da peçonha de *C. v. viridis*. Sugere-se que a PLA₂ pode agir diretamente sobre o parasita, e também que outros compostos presentes na peçonha, como as LAAOs, provavelmente têm funções sinérgicas. Em três estudos, as PLA₂s foram isoladas da peçonha de *B. brazili*, *B. mattagrossensis* e *B. moojeni* e seus efeitos antiparasitários foram verificados contra algumas espécies diferentes de *Leishmania spp.* (STÁBELI et al., 2006; COSTA et al., 2008; MOURA et al., 2014). Porém, em um outro estudo, a peçonha de *B. marajoensis* mostrou atividade leishmanicida contra *L. amazonensis* e *L. chagasi* mas duas PLA₂s isoladas não foram eficazes contra *Leishmania sp.* (COSTA TORRES et al., 2010). Além disso, uma PLA₂ catalicamente inativa isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, BnSP-7, inibiu a proliferação de formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e também causou mudanças morfológicas nos parasitas (NUNES et al., 2013) (**Tabela 2**). Comparado com o vasto número de PLA₂s de peçonhas de serpentes de espécies variadas, há poucos estudos para definir os mecanismos moleculares da ação antiparasitária dessas moléculas.

Em relação à malária, há alguns estudos investigando os efeitos antimaláricos de peçonhas de serpentes e suas PLA₂s. Entre os resultados publicados, inclui uma PLA₂ isolada da serpente *Crotalus adamanteus* que bloqueia o desenvolvimento dos oocinetos, formas do parasita *Plasmodium falciparum* e *P. gallinaceum* dentro do intestino do mosquito, em sistema *in vitro*. Os autores explicam que o mecanismo nessa situação envolve a interação da PLA₂ com a membrana das células intestinais, inibindo a ligação dos oocinetos com a mesma (ZIELER et al., 2001).

Guillaume e colaboradores (2004) mostraram efeitos antimaláricos de sete PLA₂s, algumas provenientes de peçonhas de serpentes, contra formas intraeritrocíticas de *P. falciparum*, sugerindo sua hidrólise do soro, gerando produtos lipídicos tóxicos, o qual mata o parasita. Esses estudos são corroborados por outros estudos com peçonhas de serpentes e suas PLA₂s, assim como venenos e PLA₂s de abelhas, contra *Plasmodium spp* (CASTILLO et al., 2012; QUINTANA et al., 2012; TERRA et al., 2015).

Poucos estudos referentes à caracterização dos componentes da peçonha de *Bothrops marajoensis* estão disponíveis na literatura. Portanto, para maior compreensão do envenenamento produzido pela peçonha da espécie *B. marajoensis*, inclusive seu potencial biotecnológico, os componentes químicos devem ser identificados e estudados. Uma vez que as serpentes desse gênero são responsáveis pela maioria dos casos de acidentes ofídicos anualmente no Brasil, uma maior compreensão das toxinas constituintes dessas peçonhas, em especial as svPLA₂s, é essencial para melhorar o conhecimento a cerca dessa doença negligenciada. Vale a pena ressaltar que as fosfolipases A₂ são amplamente distribuídas nos seres vivos, e também estão envolvidas em muitos distúrbios fisiopatológicos relativamente comuns em seres humanos.

No contexto das informações apresentadas anteriormente, este estudo pretende realizar a caracterização bioquímica e estrutural de uma fosfolipase A₂ básica inédita proveniente da peçonha de *Bothrops marajoensis* e a avaliação de sua atividade antiparasitária contra os protozoários causadores de Leishmaniose, Doença de Chagas e Malária.

Tabela 2: Atividade antiparasitária de peçonhas de serpentes e suas PLA₂s contra *Leishmania* spp.

Espécie	PLA ₂	Atividade Antiparasitária contra promastigotas da <i>Leishmania</i>						Referência
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. major</i>	<i>L. chagasi</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i>	
<i>Bothrops brazili</i>	MTX-I	++	++	NT	NT	NT	NT	COSTA et al., 2008
	MTX-II	++	+	NT	NT	NT	NT	
<i>Bothrops jararaca</i>		NT	NT	+++	NT	NT	NT	GONÇALVEZ et al., 2002
<i>Bothrops leucurus</i>		+++	NT	NT	+++	NT	NT	TORRES et al., 2009
	BleuPLA ₂	-	NT	NT	-	NT	NT	
<i>Bothrops lutzi</i>		+	NT	NT	+	NT	NT	DE MENEZES et al., 2012
<i>Bothrops marajoensis</i>		+	NT	NT	+	NT	NT	COSTA TORRES et al., 2010
	BmarPLA ₂	-	NT	NT	-	NT	NT	
<i>Bothrops mattogrossensis</i>	BmatTX-I	+	NT	NT	NT	NT	NT	MOURA et al., 2014
	BmatTX-II	+	NT	NT	NT	NT	NT	
	BmatTX-III	+	NT	NT	NT	NT	NT	
<i>Bothrops moojeni</i>		+++	NT	NT	NT	NT	NT	TEMPONE et al., 2001
	MjTX-II	+	+	+	NT	+	NT	STÁBELI et al., 2006
<i>Bothrops pauloensis</i>	BnSP-7	+	NT	NT	NT	NT	NT	NUNES et al., 2013
<i>Bungarus caeruleus</i>		NT	NT	NT	NT	++	NT	BHATTACHARYA et al., 2013
<i>Cerastes cerastes</i>		NT	NT	NT	NT	NT	+++	FERNANDEZ-GOMEZ, 1994
<i>Crotalus durissus cascavella</i>	Crotoxin	+++	NT	NT	NT	NT	NT	PASSERO et al., 2007
<i>Crotalus durissus collilineatus</i>		+	NT	NT	NT	NT	NT	
<i>Crotalus durissus terrificus</i>		++	NT	NT	NT	NT	NT	
<i>Micrurus spixii</i>		+++	NT	NT	NT	NT	NT	TERRA et al., 2015
<i>Naja haje</i>		NT	NT	NT	NT	NT	++	FERNANDEZ-GOMEZ, 1994
<i>Vipera lebetina</i>		NT	NT	NT	NT	NT	+	

NT=não testada; +++ IC₅₀ <10 µg/mL; ++ IC₅₀ 10-50 µg/mL; + IC₅₀ >50 µg/mL; - Nenhuma atividade antiparasitária encontrada; * IC₅₀ não foi calculado, símbolo (+++ , ++, ou +) escolhido baseado na análise qualitativa dos próprios autores

Tabela 3: Atividade antiparasitária de peçonhas de serpentes e suas PLA₂s contra *Trypanosoma cruzi*

Espécie	PLA ₂	Atividade Antiparasitária contra <i>Trypanosoma cruzi</i>			Referência
		Formas tripomastigotas	Formas amastigotas	Formas epimastigotas	
<i>Atropoides nummifer</i>		+++*	+++	+	CASTILLO-VIGIL, 2008
<i>Atropoides picadoi</i>		++*	++	+	
<i>Bothriechis schlegelii</i>		+++*	+++	++	
<i>Bothrops asper</i>		+++*	+++	++	
<i>Bothrops jararaca</i>		SR	SR	+++	GONÇALVEZ et al., 2002
<i>Bothrops leucurus</i>	BleuPLA ₂	NT	NT	+++	TORRES et al., 2009
<i>Bothrops lutzi</i>		NT	NT	+	DE MENEZES et al., 2012
<i>Bothrops marajoensis</i>	BmarPLA ₂	NT	NT	++	TORRES et al., 2009
<i>Cerastes cerastes</i>		NT	NT	+++	FERNANDEZ-GOMEZ, 1994
<i>Crotalus durissus durissus</i>		+	+++	++	CASTILLO-VIGIL, 2008
<i>Crotalus viridis viridis</i>		+++	+++	+++	ADADE et al., 2011
<i>Naja haje</i>		NT	NT	++	FERNANDEZ-GOMEZ, 1994
<i>Vipera lebetina</i>		NT	NT	+	FERNANDEZ-GOMEZ, 1994

NT=não testada; SR=sem resultado; +++ IC₅₀ <10 µg/mL; ++ IC₅₀ 10-50 µg/mL; + IC₅₀ >50 µg/mL; - Nenhuma atividade antiparasitária encontrada; * IC₅₀ não foi calculado, símbolo (+++, ++, ou +) escolhido baseado na análise qualitativa dos próprios autores

Tabela 4: Atividade antiparasitária de peçonhas de serpentes e suas PLA₂s contra *Plasmodium falciparum*

Espécie	PLA ₂	Atividade antiparasitária contra <i>P. falciparum</i>				Referência
		Formas oocinéticas	Formas intraeritrocíticas			
			Não especificado	Trofozoítos	Esquizontes	
<i>Agkistrodon halys</i>	PLA ₂	NT	+++	+++	++	GUILLAUME et al., 2004
<i>Apis mellifera</i>	PLA ₂	NT	+++	+++	-	
<i>Bothrops asper</i>	V VI	NT	+++	NT	NT	CASTILLO et al., 2012
		NT	++	NT	NT	
		NT	+	NT	NT	
<i>Crotalus adamanteus</i>	PLA ₂	+++*	NT	NT	NT	ZIELER et al., 2001
<i>Crotalus durissus cumanensis</i>	II Crotoxin B	NT	+++	NT	NT	QUINTANA et al., 2012
		NT	+++	NT	NT	
		NT	+++	NT	NT	
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Crotoxin	++*	NT	NT	NT	ZIELER et al., 2001
<i>Micrurus spixii</i>		NT	+++	NT	NT	TERRA et al., 2015
<i>Naja mossambica mossambica</i>	I II III	++*	NT	NT	NT	ZIELER et al., 2001
		++*	NT	NT	NT	
		+*	NT	NT	NT	
<i>Naja mossambica mossambica</i>	PLA ₂	NT	++	+++	+	GUILLAUME et al., 2004
<i>Naja naja</i>	PLA ₂	++*	NT	NT	NT	ZIELER et al., 2001
<i>Notechis scutatus scutatus</i>	Notexin	NT	++	++	++	
<i>Pandinus imperator</i>	IpTxI	NT	++	+++	+	GUILLAUME et al., 2004
<i>Vipera ammodytes</i>	Ammodytoxin	NT	++	+++	++	

NT=não testada; +++ IC₅₀ <1 µg/mL; ++ IC₅₀ 1-10 µg/mL; + IC₅₀ >10 µg/mL; - Nenhuma atividade antiparasitária encontrada; * IC₅₀ não foi calculado, símbolo (+++, ++, ou +) escolhido baseado na análise qualitativa dos próprios autores

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização bioquímica de uma nova fosfolipase A₂ homóloga Lys49 a partir da peçonha da serpente *Bothrops marajoensis* com potencial parasiticida contra *Leishmania*, *Trypanosoma*, e *Plasmodium*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar uma nova fosfolipase A₂ homóloga Lys49 com alto grau de pureza a partir da peçonha de *Bothrops marajoensis*;

Obter a massa molecular, ponto isoelétrico e estrutura primária;

Realizar a busca de similaridade da sequência parcial com outras PLA₂s descritas;

Analisar as estruturas secundárias com dicroísmo circular;

Verificar a oligomerização por meio de ensaios de espalhamento de luz dinâmico;

Determinar a atividade enzimática;

Avaliar a atividade antiparasitária da peçonha e da toxina isolada *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania infantum*, formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e formas intraeritrocíticas de *Plasmodium falciparum*;

Executar testes de citotoxicidade contra células mamíferas HepG2.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA PLA₂ BÁSICA DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops marajoensis*

3.1.1 Peçonha e autorização

A peçonha de *Bothrops marajoensis* foi obtida de um *pool* de espécimes adultos, adquirida do Serpentário Bioagents (Batatais – SP) e gentilmente doada pelo Prof. Dr. José Roberto Giglio (*in memoriam*) da FMRP-USP, Brasil. A peçonha desidratada foi mantida sob refrigeração (4°C) no Banco de Venenos Amazônicos no Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde, CEBio-UNIR/FIOCRUZ-RO; autorização: CGEN/CNPq 010627/2011-1 (**Anexo 9.1**).

3.1.2 Cromatografia de troca iônica

Uma alíquota de 400 mg da peçonha de *B. marajoensis* foi solubilizada em 2 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 50 mM, pH 8,0 (Tampão A) e centrifugada a 7000 *xg* durante 5 minutos para remoção do material insolúvel. O sobrenadante foi fracionado em coluna CM-Sepharose (90 cm x 1,5 cm) equilibrada com o mesmo tampão usado para solubilizar a peçonha. Um gradiente linear de 0 a 100% de AMBIC 500 mM pH 8,0 (Tampão B) foi usado por 600 minutos sob fluxo de 2,5 mL/minuto, em sistema de cromatografia *Akta Purifier* (GE). A eluição foi monitorada em filtros de 215 e 280 nm e coletada manualmente. As amostras foram liofilizadas e armazenadas em geladeiras (-20°C).

3.1.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) foi realizada na presença de SDS (SDS-PAGE), em sistema descontínuo de pH, em condições redutoras e não redutoras, descritos por (LAEMMLI, 1970) com adaptações. As frações cromatográficas foram subilizadas em água e uma alíquota de 10 µL contendo 10 µg de proteínas foram misturadas em proporção 1:1 com uma solução contendo SDS 4% (m/v), azul de Bromofenol 0,2% (m/v), glicerol 20% (v/v) em Tris 100

mM pH 6,8 e aquecidas por 5 minutos em 90°C. Para condições redutoras, também foi adicionado Dithiothreitol (DTT). A eletroforese foi realizada sob amperagem constante (15 mA) por cerca de 90 minutos. Após isso, o gel de poliacrilamida foi fixado em uma solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 7% (v/v) por 30 minutos e depois imerso em solução contendo *Coomassie Brilliant Blue G-250*[®] 0,08% (m/v), sulfato de alumínio 8,0% (m/v), ácido o-fosfórico 1,6% (m/v) e metanol 20,0% (v/v) por aproximadamente 30 minutos para visualizar as bandas de proteína. O excesso de corantes foi retirado por imersão durante 12 horas em solução descorante contendo etanol 4% e ácido acético 7% (v/v) em água. Foi utilizado *Image scanner*[®] (*GE Healthcare Lifescience*) para documentar o gel.

3.1.4 Dosagem de proteínas utilizando o método Lowry

Uma alíquota de 5 µL de cada amostra foi aplicada em uma placa de 96 poços seguido por 25 µL da solução DC proteín A BioRad[®] e 200 µL da solução DC proteín B BioRad[®] como descrito pelo fabricante. Para o branco foi utilizado 5 µL de água no lugar da amostra. Cada fração e o branco foram feitos em triplicato. A placa foi então inserida no espectrofotômetro e depois de incubação por 15 minutos em temperatura de 37°C, a absorbância de cada poço foi registrada em comprimento de onda de 595 nm. A concentração das amostras foi determinada pela comparação com curva construída utilizando-se BSA como padrão.

3.1.5 Cromatografia de fase reversa

A fração 11 da cromatografia de troca iônica foi diluída em ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (Solução A) e submetida a fracionamento cromatográfico de fase reversa em coluna C18 (25 cm x 0,45 cm – *Discovery*) previamente equilibrada com a solução A e eluída sob gradiente de 0 a 70% de solução B [ACN 99,9% (v/v) e TFA 0,1% (v/v)] por 5 volumes de coluna, sob fluxo de 1 mL/minuto. A eluição da amostra foi monitorada em 280 nm. Uma recromatografia da fração principal dessa cromatografia de fase reversa foi realizada sob as mesmas condições descritas anteriormente. As amostras foram coletadas manualmente, liofilizadas e armazenadas a -20°C.

3.1.6 Determinação da massa molecular

A massa molecular da proteína isolada foi determinada por espectrometria de massa utilizando um aparelho MALDI (dessorção assistida por ionização da matriz a laser) em modo linear com dois analisadores TOF (AXIMA TOF² Shimadzu Biotech). Os padrões de massa molecular de insulina, (5.734,5 Da), Citocromo C (12.361,9 Da), Apomioglobina (16.952,2 Da), Aldolase (39.212,2 Da) e Albumina (66.430,0 Da) foram utilizadas para calibrar o equipamento. Alíquota contendo 1 µg de cada amostra foi solubilizada em TFA 0,1% (v/v), co-cristalizada com solução saturada de ácido sinapínico (matriz de ionização) e aplicada em placa metálica. As razões massa/carga até 4 décimos foram calculadas pelo equipamento. As massas moleculares foram registradas em Daltons.

3.1.7 Determinação do ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico da proteína isolada foi determinado por eletroforese bi-dimensional (2D-SDS-PAGE). A amostra foi solubilizada em solução de hidratação contendo ureia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2,0% (m/v), *immobilized pH gradient buffer (IPG buffer*[®]) 0,5% (v/v) e azul de bromofenol 1,0% (m/v); e aplicada sobre tiras de poliacrilamida de 7 cm com gradiente de pH de 3,0 a 10,0 imobilizado de forma não linear (*Immobiline DryStrip*[®]). A focalização isoelétrica foi realizada para posicionar a proteína em seu ponto isoelétrico no *IPGphor III System*[®] (*GE Healthcare Life Science*) de acordo com as instruções do fabricante. Após a focalização isoelétrica, a tira contendo a proteína foi posicionada na porção superior do gel de SDS-PAGE 12,5% (m/v) para realização de eletroforese monodimensional, conforme descrito em 3.1.3. Essa etapa posicionou a proteína baseada em sua massa molecular. A imagem do gel foi obtida com auxílio de um *Image Scanner III*[®].

3.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE Bmaj-II

3.2.1 Dicroísmo circular

Ensaio de dicroísmo circular foram realizados em um espectropolarímetro Jasco J-815 (JASCO Inc., Tóquio, Japão), equipado com um regulador de temperatura PTC-423-S. A toxina isolada foi solubilizada em AMBIC 50 mM pH 9 na concentração de 0,5 mg/mL. Todas as medidas foram registradas no intervalo espectral de 190-260 nm em 20°C, utilizando comprimento de caminho óptico de 0,05 mm com velocidade de 100 nm/minuto, largura de banda de 2 nm e tempo de resposta de 1 s. A absorção diferencial foi calculada utilizando a lei de Beer-Lambert: $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$, onde A é a absorbância; ε é o coeficiente de extinção molar; c é a concentração das moléculas no meio e l é o caminho óptico. O espectro final é resultado de 20 espectros que foram acumulados e corrigidos baseado na contribuição do tampão e normalizados para elipicidade molar residual média ($[\theta]$; deg.cm/mol). Essa transformação é dada pela equação: $[\theta] = (\theta \cdot 100 \cdot M) / (C \cdot l \cdot n)$, onde θ está em graus, M é a massa molecular da proteína (em Daltons), C é a concentração da proteína (em mg/mL), l é o caminho óptico (em cm) e n é o número de resíduos (CORRÊA e RAMOS, 2009). Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Professor Dr. Marcos R. M. Fontes, UNESP, Botucatu-SP.

3.2.2 Espalhamento de luz dinâmico

O espalhamento de luz dinâmico foi realizado com a toxina isolada solubilizada em AMBIC 50 mM pH 9 na concentração de 1 e 2 mg/mL. A amostra foi filtrada usando membrana de PVDF com poros de 0,22 μm (*Millipore*) e centrifugada a 10100 $\times g$ por 10 minutos em 0°C, antes do ensaio. Os dados de cem medidas foram coletados em temperaturas de 10, 20 e 25°C em ângulo fixo de 90° no equipamento *DynaPro TITAN* (*Wyatt Technology*). Todos os resultados foram analisados com o *software Dynamics* v.6.10. Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Professor Dr. Marcos R. M. Fontes, UNESP, Botucatu-SP.

3.2.3 Sequenciamento N-terminal

O sequenciamento dos resíduos de aminoácidos da região N-terminal da proteína isolada foi feito utilizando 10 µg da proteína. Utilizou-se um microsequenciador automático PPSQ-33A (Shimadzu) e o método de degradação química de Edman (EDMAN, 1950).

3.2.4 Digestão triptica e espectrometria de massa dos peptídeos

A fragmentação da proteína isolada foi realizada por meio do processo de tripsinização. A proteína foi solubilizada em água Milli-Q e 50 µg foi adicionado em 10 µL de uma solução composta por 6 M uréia e 100 mM Tris pH 8,0. Foi adicionado 2 µL do agente redutor, DTT 200 mM e Tris 100 mM pH 8,0 e a solução foi incubada durante uma hora a 37°C em ambiente escuro. Posteriormente, foi adicionado 2 µL de agente alquilante, iodoacetamida 200 mM e Tris 100 mM pH 8,0 e a solução foi novamente incubada por uma hora a 37°C. Após isso, foi acrescentado 4 µL de agente redutor, DTT 200 mM e Tris 100 mM pH 8,0, seguida de incubação por uma hora a 37°C. Subsequentemente, foi adicionado 75 µL de água milli-Q à amostra para reduzir a concentração de uréia para 0,6 M, e 10 µL (2 µg) de tripsina. A solução foi incubada em banho seco por 24 horas a 37°C. Em seguida, foi adicionado 1 µL de TFA 0,1%. A amostra foi liofilizada e armazenada em -20°C.

Sucessivamente, realizou-se a análise dos fragmentos em colaboração com o pesquisador Dr. Daniel Carvalho Pimenta no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantã. A amostra foi solubilizada em 50 µL ácido acético 0,1% (tampão A), injetada na coluna de fase reversa C18 (Supelco, 3 µm, 100 Å, 50 mm x 2,1 mm) e eluída com um gradiente de 5-40% de tampão B (90% acetonitrilo/H₂O com 0,1% ácido acético) durante 40 minutos, em fluxo constante de 0,2 mL/minuto. Os eluídos do HPLC foram monitorizados por um detector Shimadzu SPD-M20A PDA de 200 a 500 nm (passos de 1 nm). Os espectros de MS foram adquiridos no espectrômetro de massa ESI-IT-TOF (Electrospray-Ion Trap-Time of Flight) (Shimadzu Co., Japão) em modo positivo, com voltagem de interface de 4,5 kV, voltagem de detector a 1,76 kV, temperatura de interface a 200°C, e analisados no intervalo de 50-2000 m/z, obtidos por gás de colisão argônio, com 50% de energia. Para o processamento dos dados foi utilizado o software

LabSolutions (LCMS solution 3.60.361, Shimadzu). Os espectros MS/MS gerados foram analisados pelo software *Peaks Mass Spectrometry* (*Bioinformatics Solutions Inc.*, Canadá).

3.2.5 Identificação da toxina por PEAKS

Utilizou-se o *software PEAKS studio 7.0*, associado a ferramenta *InChorus multi-algorithmic*. Com isso, foi calculada a maior probabilidade dos aminoácidos em cada posição da sequência primária da toxina. Posteriormente, os fragmentos foram comparados com sequência de proteínas depositadas em bancos de dados para elucidar a relativa posição de cada fragmento tripsinizado na sequência primária da toxina. As sequências dos fragmentos foram combinados para determinar a sequência parcial da proteína.

3.2.6 Estudo de similaridade

Após a obtenção da sequência parcial da Bmaj-II, foi realizada busca por similaridade nos bancos de dados UniProtKB e NCBI utilizando o algoritmo BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). O alinhamento múltiplo com a Bmaj-II foi realizado utilizando o programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/tools/msa.clustalw2/>). Os gráficos apresentando regiões conservadas entre as sequências foram criados utilizando o programa *Weblogo* da Universidade de Berkeley (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

3.3 ENSAIO DE ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

A atividade fosfolipásica foi realizada por uma reação colorimétrica utilizando como reagente o ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzóico (4N3OBA). Alíquotas de 200 µg do reagente foram solubilizadas com 2 mL de uma solução de Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM e, em seguida agitadas. A peçonha de *B. marajoensis* e a toxina a ser analisada foram diluídas em água milli-Q para obter uma concentração de 1 µg/µL. Em uma placa de 96 poços foram aplicados 10 µL da amostra e 190 µL da solução de 4N3OBA (triplicata). Utilizou-se como controle negativo água destilada e como controles positivos 1 µg/µL de BthTX-II. Imediatamente, a placa foi incubada em espectrofotômetro a 37°C e a densidade óptica (OD) mensurada em 425

nm, sob intervalos cinéticos de 30 segundos durante um período de 30 minutos. Os resultados foram submetidos a análise de variância seguidos de *pos test* de Tukey com $p < 0,05$.

3.4 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

3.4.1 Atividade antipromastigota *in vitro* contra *Leishmania infantum*, MCAN/ES/92/BNC83

Utilizou-se placas de 96 poços, onde 3×10^5 parasitos na forma promastigotas/poço foram plaqueados com 200 μL de meio de cultura Schneider suplementado com 10% de SBF e diferentes concentrações de peçonha ou proteína purificada da peçonha de *B. marajoensis* (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$) ou meio de cultura (branco). Como controle positivo, utilizou-se 100 $\mu\text{g/mL}$ de pentamidina. Cada condição foi testada em triplicata. Posteriormente, foi adicionada 20 μL de Resazurina (Sigma®) 3 mM. A placa foi novamente submetida a incubação, a 26°C durante 4 horas e por fim a absorvância foi determinada a 595 e 495 nm. A eficácia de cada composto foi estimada calculando a porcentagem de parasitas mortos, e assim a atividade anti-promastigota.

3.4.2 Atividade antiepipimastigota *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi*, Cepa CL-clone B5

Utilizou-se placas de 96 poços, onde 5×10^4 parasitos na forma epimastigotas/poço foram plaqueados com 200 μL de cultura *liver infusion tryptose* (LIT), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e diferentes concentrações de peçonha ou proteína purificada da peçonha de *B. marajoensis* (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$) ou meio de cultura (branco). Como controle positivo, utilizou-se 100 $\mu\text{g/mL}$ de benzonidazol. A placa foi incubada a 28°C durante 72 horas. Cada concentração foi testada em triplicata. Posteriormente, foi adicionada 50 μL de CPRG 200 μM ; a placa foi novamente incubada a 37° durante 4 horas e por fim, a absorvância foi determinada a 595 nm. A eficácia de cada composto foi estimada calculando a porcentagem de parasitas mortos, e assim a atividade anti-epimastigota.

3.4.3 Atividade antimalárica *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*

Utilizou-se placas de 96 poços, adicionando-se 180µL/poço de meio de cultura RPMI contendo: 0,05% de parasitemia e 1,5% de hematócrito para o teste de ELISA anti-HRP2. Também foram adicionados, em triplicata, diferentes concentrações seriadas da peçonha de *B. marajoensis* (3-0,09 µg/mL) e da PLA₂ isolada (12,5-0,39 µg/mL). Adicionou-se hemácias infectadas como controle negativo e artemisinina (Sigma®) (50-3,125 ng/mL) como controle positivo. A placa foi incubada durante 72 horas a 37°C, e em seguida congelada e descongelada duas vezes à -70°C para que ocorra a lise das hemácias.

Posteriormente, foi realizado o teste imunoenzimático anti-HRP2 no qual 100µL do anticorpo primário (MPFM 55A ICLLAB®, EUA) a 1,0 µg/mL foram adicionados a cada poço da placa de ensaio e novamente incubada por 12 a 16h a 4°C. Após esse tempo, o conteúdo dos poços foi descartado e 200 µL/poço de uma solução de bloqueio (PBS-BSA 2%) adicionada, com a placa mantida à temperatura ambiente durante 2h. Em seguida, o conteúdo dos poços foi novamente descartado, a placa lavada três vezes com PBS-Tween 20 a 0,05% (PBS-T), e foram adicionados 100 µL das amostras da cultura de *P. falciparum* hemolisadas. Como controle negativo, foram adicionados 100 µL de amostra congelada pré-sensibilizada com o anticorpo monoclonal anti-HRP2, e depois a placa foi incubada por 1h à temperatura ambiente, em câmara úmida. Então, a placa foi lavada três vezes com PBS-T, adicionando-se a cada poço 100 µL do anticorpo secundário (MPFG55P ICLLAB®, EUA) diluído a 1:5.000 (v:v). Essa lavagem foi repetida novamente e 100 µL de 5% 3,3',5,5'Tetrametilbenzidina (TMB) foram acrescentados a cada poço. A placa foi incubada por 5 a 10 minutos à temperatura ambiente, em ambiente escuro, e adicionou-se 50µL/poço de uma solução de ácido sulfúrico 1M para interromper a reação. A absorbância foi lida a 450nm em um espectrofotômetro de microplacas (Kasvi®).

A inibição do crescimento de 50% dos parasitos foi determinada por meio de curvas dose-resposta, em função de regressão não linear utilizando o programa *Origin* (*OriginLab Corporation*, Northampton, MA, EUA).

3.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA

3.5.1 Atividade citotóxica contra células hepáticas, HepG2

A citotoxicidade das células expostas aos compostos foi avaliada através do método colorimétrico do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), conforme descrito por Teles e colaboradores (2011). A linhagem celular HepG2 (derivada de um hepatoma humano) foi mantida em *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) contendo 10% de SFB e 40mg/L de gentamicina, em estufa com 5% de CO₂, a 95% de umidade a 37°C.

Primeiro verificou-se a viabilidade das células hepática, HepG2, utilizando uma avaliação qualitativa por meio de observação no microscópio e avaliação quantitativa por meio de contagem de células viáveis. Uma alíquota de células foi centrifugado por 5 minutos a 6000 *xg* e o sobrenadante foi descartado. Acrescentou-se 1 mL de meio de cultura novo RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino inativado (FBS) a 10%, 20 mmol L⁻¹ de HEPES (N-2-ácido) etanossulfônico-hidroxietilpiperazina-N'-2, e 50 mg/mL de gentamicina. Tirou-se 10 µL de células para contagem utilizando corante eritrosina BA 0,4%. Calculou-se dessa contagem a quantidade de parasita necessária para obter 1x10⁴ células em 30 µL de solução em cada poço durante o experimento. Uma amostra com alta concentração de células não viáveis não é utilizada para os ensaios. A toxina a ser testada assim como a peçonha e controles foram diluídos em PBS de acordo com a quantidade seca de cada uma. Utilizou-se uma placa de 96 poços com volume final de 200 µL em cada poço, 20 µL de meio de cultura e droga a ser testada ou controle, 30 µL de célula hepática e meio de cultura e mais 150 µL de meio de cultura. As drogas a serem testadas foram distribuídas na placa para obter concentrações de 3,125 µg/mL – 100 µg/mL todas em triplicata. Como controle negativo utilizou-se meio de cultura, PBS, e células HepG2. Como controle positivo, utilizou-se 10% Dimetilsulfóxido (DMSO). A placa foi incubada durante 72 horas em estufa a 24°C. Depois disso, 10 µL de uma solução de MTT (5 mg/mL em solução de fosfato salina tamponada) foram adicionados a cada poço e incubadas durante 4 horas a 23°C, então centrifugadas a 8000 *xg* durante 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. A absorbância foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm para obter um valor indicativo da viabilidade do parasita. A percentagem de citotoxicidade foi determinada pela equação:

$$\% \textit{ citotoxicidade} = 1 - \left[\frac{\textit{absorb. das células tratadas} - \textit{absorb. das células do branco}}{\textit{absorb. das células controle} - \textit{absorb. das células do branco}} \right] \times 100$$

A concentração inibitória 50% (IC₅₀) foi estimada por ajuste de curva dose resposta usando o programa da *OriginLab Corporation* (Northampton, MA, USA).

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *Graph Pad Prism* versão 6.0. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste ANOVA seguido por *pos test* de Tukey com valor $p \leq 0,05$ considerado como significativo.

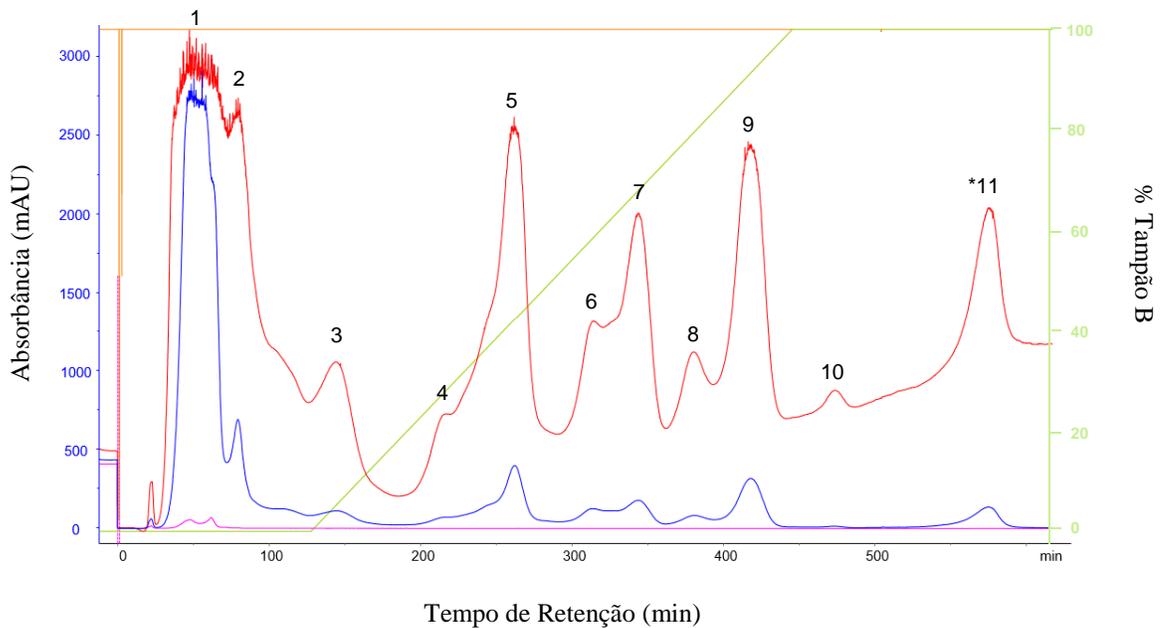
4 RESULTADOS

4.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA PLA₂ BÁSICA DA PEÇONHA DA SERPENTE *B. marajoensis*

4.1.1 Isolamento da PLA₂

Para o isolamento de uma PLA₂ básica da peçonha de *Bothrops marajoensis* foram utilizadas duas etapas de cromatografia, sendo uma primeira de troca catiônica e uma subsequente de fase reversa (**Figuras 9 e 11**). O fracionamento da peçonha em resina de troca catiônica permitiu a separação em 11 frações principais (1-11) (**Figura 9**).

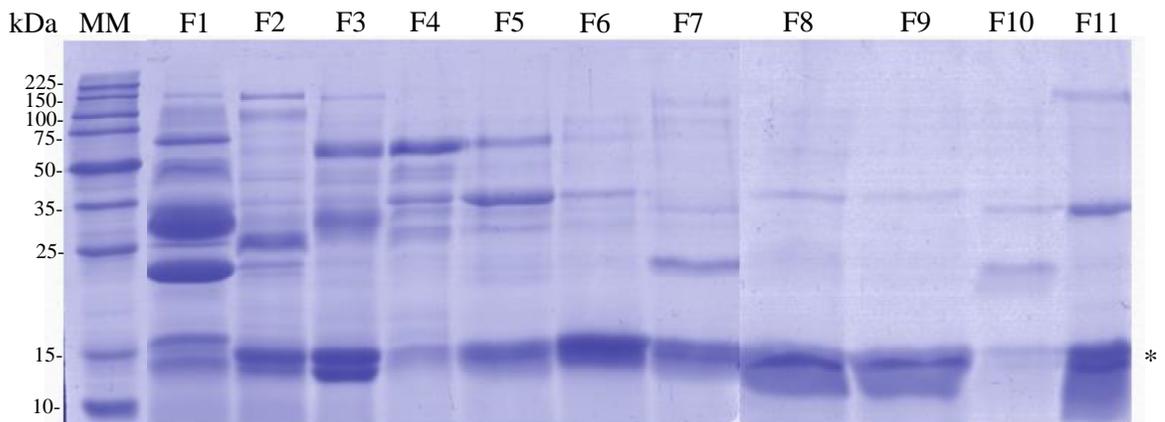
Figura 9: Perfil cromatográfico da peçonha de *Bothrops marajoensis* utilizando resina de troca catiônica



Perfil cromatográfico da peçonha de *Bothrops marajoensis* utilizando a cromatografia de troca catiônica em uma coluna CM-Sepharose (90 x 1,5 cm) previamente equilibrada com o Tampão A (AMBIC 50 mM pH 8,0) e as frações eluídas sob gradiente de 0 a 100% do Tampão B (AMBIC 500 mM pH 8,0) em fluxo constante de 2,5 mL/minuto. *Indica a fração 11 (F11) selecionada para futuras etapas de fracionamento. A eluição das proteínas foi monitorada por absorbância a 215 nm (—) e 280 nm (—). O gradiente linear do Tampão B é indicado com a linha verde (—).

As 11 frações obtidas a partir da cromatografia de troca iônica foram analisadas por eletroforese mono-dimensional em gel de poliacrilamida 12,5% em condições redutoras. A fração 11 foi selecionada para ser aplicada nas outras etapas cromatográficas baseado em sua característica básica e a presença de um componente com massa molecular relativa de 14 kDa, compatível com a proteína de interesse (**Figura 10**).

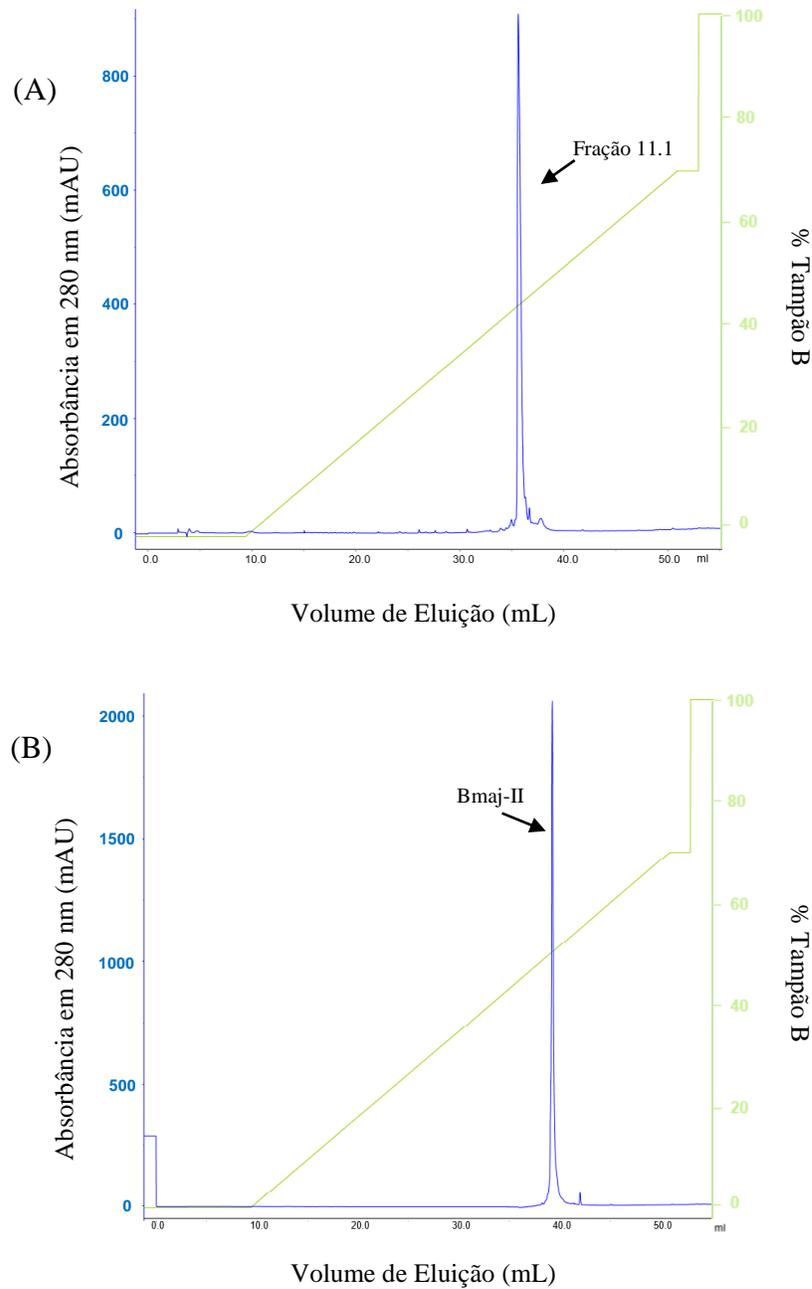
Figura 10: Eletroforese monodimensional das frações cromatográficas da peçonha de *B. marajoensis* em resina de troca iônica



Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições redutoras (com DTT) da padrão de massa molecular (MM) e das frações 1-11 da cromatografia de troca iônica da peçonha de *B. marajoensis*. Destaca-se uma banda de massa molecular aproximada a 14 kDa na fração 11 (*).

Como segunda etapa de isolamento da PLA₂ foi realizada uma cromatografia de fase reversa em coluna C18. A fração 11 da cromatografia de troca iônica foi submetida a uma cromatografia de fase reversa (**Figura 11A**), onde a fração principal (11.1) foi selecionada e recromatografada nas mesmas condições evidenciando seu grau de pureza (**Figura 11B**).

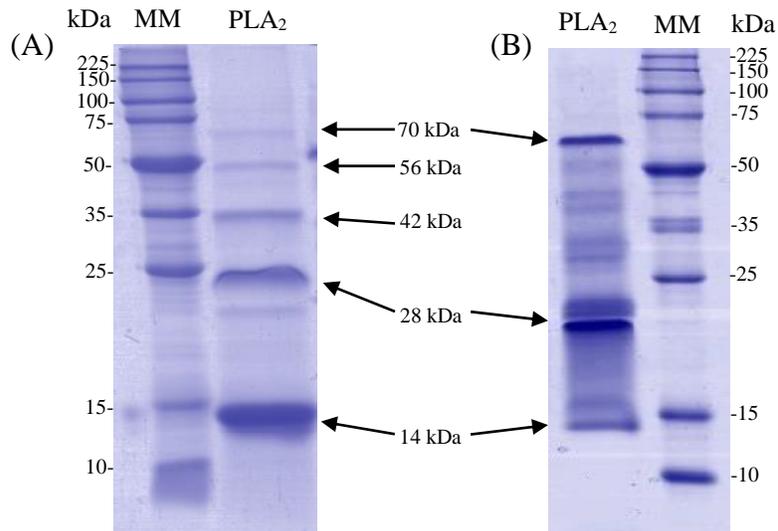
Figura 11: Perfis cromatográficos de fase reversa



Perfis cromatográficos da fração 11 da troca iônica em uma coluna de Fase Reversa (C18 *Discovery*) previamente equilibrada com TFA 0,1% (Tampão A) e eluída com ACN 99%+TFA 0,1% (Tampão B) em gradiente de 0-100%, sob fluxo constante de 1mL/minuto. A eluição das proteínas foi monitorada por absorbância a 280nm (—). O gradiente linear do Tampão B é indicado com a linha verde (—). **A)** Cromatografia de fase reversa da fração 11 da troca iônica. **B)** Recromatografia de fase reversa da fração 11.1 da primeira fase reversa, confirmando o grau de pureza da PLA₂, denominada de Bmaj-II.

A toxina isolada foi analisada utilizando eletroforese monodimensional em gel de poliacrilimada 12,5% SDS-PAGE em condições redutoras e não-redutoras, com e sem DTT, respectivamente. A oligomerização da PLA₂ foi observada em ambos os géis nas formas monomérica, dimérica, trimérica, tetramérica, e pentamérica em condições redutoras e formas monomérica, dimérica, e pentamérica em condições não-redutoras (**Figura 12**).

Figura 12: Eletroforese monodimensional da PLA₂ isolada e da peçonha de *B. marajoensis*

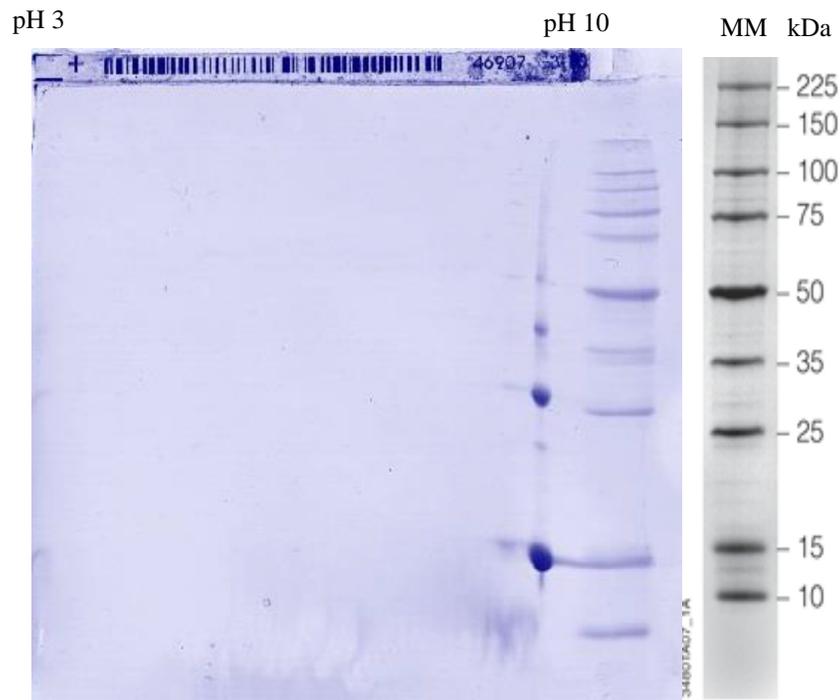


Eletroforese monodimensional em gel de poliacrilamida 12,5% em condições redutoras e não redutoras. **A)** Condições redutoras com DTT apresentando padrão de massa molecular de 10 a 225 kDa (linha 1), PLA₂ (linha 2). Destaca-se as bandas com massa molecular aproximada de 14, 28, 42, 56, e 70 kDa na faixa contendo a PLA₂. **B)** Condições não redutoras apresentando a PLA₂ (linha 1) e padrão de massa molecular de 10 a 225 kDa (linha 2).

4.1.2 Determinação do ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico (pI) da Bmaj-II foi determinado por eletroforese bidimensional, sendo observado um pI igual a 9,68 (**Figura 13**). A oligomerização observada em eletroforese monodimensional em condições redutoras foi confirmada no gel de eletroforese bidimensional mostrando as formas monomérica, dimérica, trimérica, tetramérica e pentamérica.

Figura 13: Eletroforese bidimensional (2D) da PLA₂ isolada

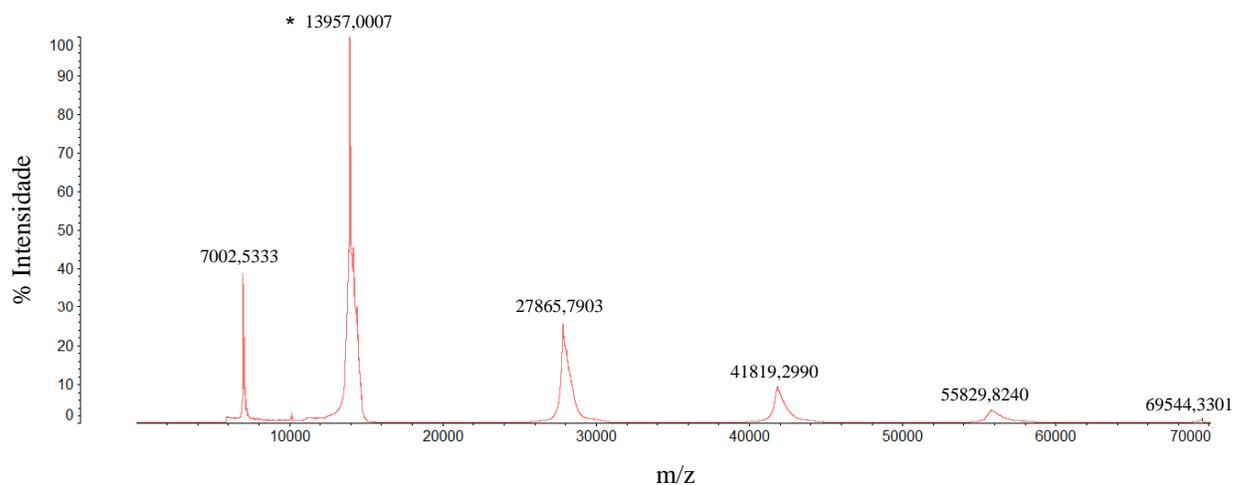


Eletroforese bidimensional (2D) da PLA₂ básica isolada da peçonha de *B. marajoensis* utilizando uma tira de poliacrilamida de 7 cm com gradiente de pH de 3,0 a 10,0. Destaca-se as bandas em pI de 9,68 com massa molecular aproximada de 14, 28, 42, 56 e 70 kDa.

4.1.3 Determinação da massa molecular

A análise de espectrometria de massa da proteína isolada mostra massa molecular da PLA₂ de 13.956,00 Da em sua forma monomérica. Em intensidades menores, também são aparentes picos em massas moleculares da molécula em forma de dupla carga (7.001,53 Da), dímero (27.865,79 Da), trímero (41.818,30 Da), tetrâmero (55.829,82 Da) e pentâmero (69.543,33 Da).

Figura 14: Espectro de massa em AXIMA TOF² da PLA₂ isolada



Espectro de massa da PLA₂ obtido em equipamento AXIMA TOF². O espectro demonstra a relação massa carga da enzima na forma de monômero, *13957,00. Também aparecem as formas de dupla carga ($m/z = 7002,53$), dímero ($m/z = 27866,79$), trímero ($m/z = 41819,30$), tetrâmero ($m/z = 55830,82$) e pentâmero ($m/z = 69544,33$).

4.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE Bmaj-II

4.2.1 Dicroísmo circular

Para melhor elucidar as estruturas secundárias da Bmaj-II, foi realizada uma análise de dicroísmo circular. Pelos valores, utilizando os algoritmos CONTIN e CDSSTR e a ferramenta online DichroWeb, estimou-se cerca de 45% da proteína com a estrutura secundária de alfa hélices e 15% folhas beta. Isso e a observação do padrão de elipsidade do gráfico demonstram características típicas de fosfolipases para a Bmaj-II (**Figura 15**).

Figura 15: Dicroísmo circular da Bmaj-II

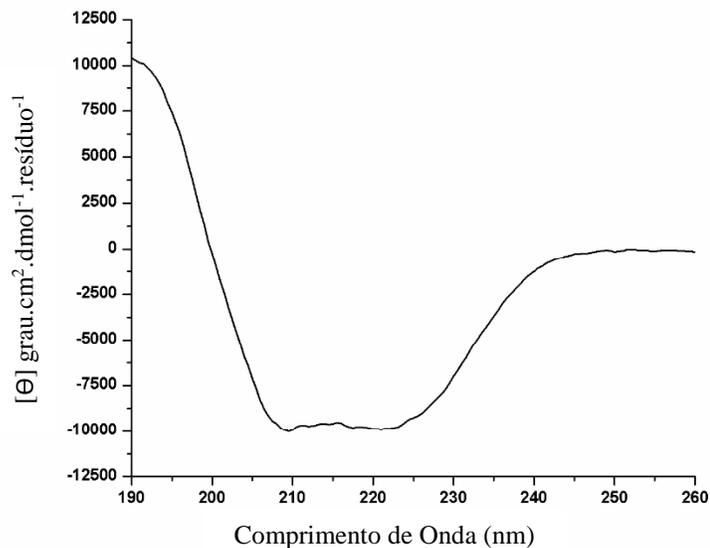


Gráfico apresentando os resultados dos experimentos realizados de dicroísmo circular utilizando a PLA₂ Bmaj-II. Destaca-se a elipsidade do gráfico e os picos representando uma grande quantidade de alfa-hélices e menos folhas betas, características típicas de estruturas secundárias contidas em fosfolipases A₂.

4.2.2 Espalhamento de luz dinâmico

A Bmaj-II apresenta grande capacidade de agregação em pH próximo a seu ponto isoelétrico. Realizando tratamento por centrifugação e filtração (membrana de PVDF de 0,22 μm), diminui cerca de 50% da concentração inicial, após o tratamento convencional (apenas centrifugação a 10100 $\times g$, 10 minutos e 0°C). Em ambas situações a proteína apresenta agregação temperatura- e/ou tempo-dependente. No entanto, para as situações com baixa polidispersidade (Pd) (perto de 15%), os resultados sugerem (dentro do erro da técnica) Bmaj-II em dímeros e tetrâmeros (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 - Bmaj-II em forma dimérica em AMBIC 50 mM pH 9 (1 mg/mL após centrifugação e filtração)

Temperatura (°C)	R _H (nm)	Pd (%)	MM (kDa)	Intensidade (%)	Massa (%)
10	2,0	17,5	24	8,4	93,0
20	-	-	Agregados	83,0	100
25	-	-	Agregados	100	100

R_H = Raio Hidrodinâmico; Pd = Polidispersidade; MM = Massa Molecular

Tabela 6 - Bmaj-II em forma tetramérica em AMBIC 50 mM pH 9 (2 mg/mL após centrifugação)

Temperatura (°C)	R _H (nm)	Pd (%)	MM (kDa)	Intensidade (%)	Massa (%)
10	3,4	14,0	54	19,5	97,0
20	-	-	Agregados	100	100
25	-	-	Agregados	100	100

R_H = Raio Hidrodinâmico; Pd = Polidispersidade; MM = Massa Molecular

4.2.3 Determinação da estrutura primária e estudos de similaridade

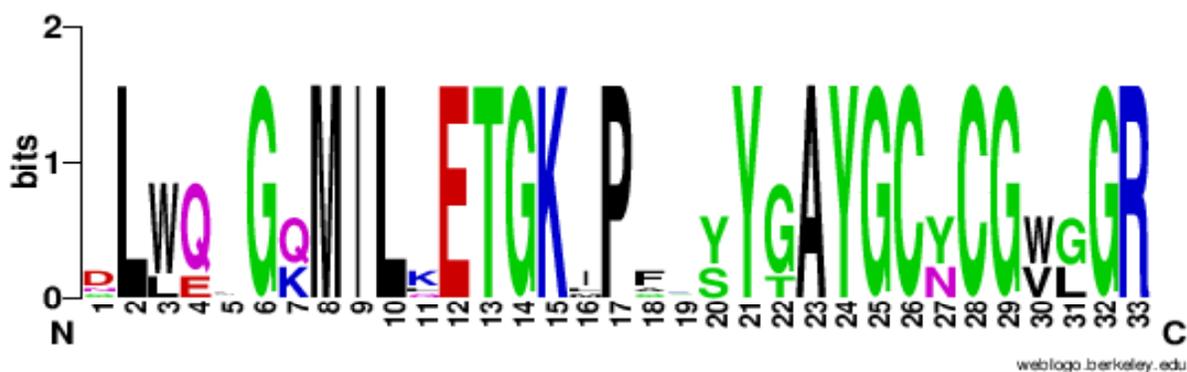
A estrutura primária parcial da proteína isolada foi determinada por sequenciamento N-terminal pelo método de degradação química de Edman e por tripsinização, mostrando elevada identidade com outras PLA₂s básicas de peçonhas botrópicas. Foram determinados 94 resíduos de aminoácidos, constituindo aproximadamente 80% da estrutura primária completa da proteína isolada, o qual foi denominada Bmaj-II. Alguns aminoácidos bem conservados entre as PLA₂s

Figura 18: Sequência parcial da Bmaj-II e outras PLA₂s conhecidas da peçonha de *B. marajoensis*

Bmaj -9	DLWQWGQMI LKETGKLPFSYYTAYGCYCGWGGRGGKPKADTDRCFFVHDC-----	50
Bmj eTX-I	DLWQFGQMI LKETGKI PFPYYGAYGCYCGWGGRGGKPKAGTDRCCYVHDCCYGKLTSCP	61
Bmj eTX-II	DLWQWGQMI LKETGKI PFSYYGAYGCYCGWGGRGGKPKAGTDRCCYVHDCCYGKLTSCP	61
Bmaj -II	NLWQLGKMI LLETGKI PAKSYGAYGCNCGVLGRXXXXXXXXXXCCYVHKXXXXXKLTC	61
BmarPLA2	SLLELGKMI LOETGKMPSKSYGAYGCNCGVLGR-----	33
	.*.:*.*** ***.** * ** ** ** ** **	

Bmaj -9	-----	50
Bmj eTX-I	DDRYSYSWLDGTI VCGEDDPC-KELCECDKKI AVCFRENLTGYNKKYRYHLKSKKADKPC	121
Bmj eTX-II	DDRYSYSRLDLTI VCGEDDPC-KELCECDKKI AVCFRENLTGYNKKYRYHLKSKKADKPC	121
Bmaj -II	XXXYSYSWKKXTI VCGENNSCLKELCECDKAVAI CLRENLDTYNKKXXYNLKP	116
BmarPLA2	-----	33

Alinhamento múltiplo da sequência parcial da Bmaj-II com as outras PLA₂s descritas da peçonha de *B. marajoensis*. *Representa os resíduos conservados entre todas as sequências. :Indica conservação entre grupos de propriedades fortemente similares = > 0.5 no *Gonnet PAM 250 matrix*. .Indica conservação entre grupos de propriedades fracamente similares = < 0.5 no *Gonnet PAM 250 matrix*.

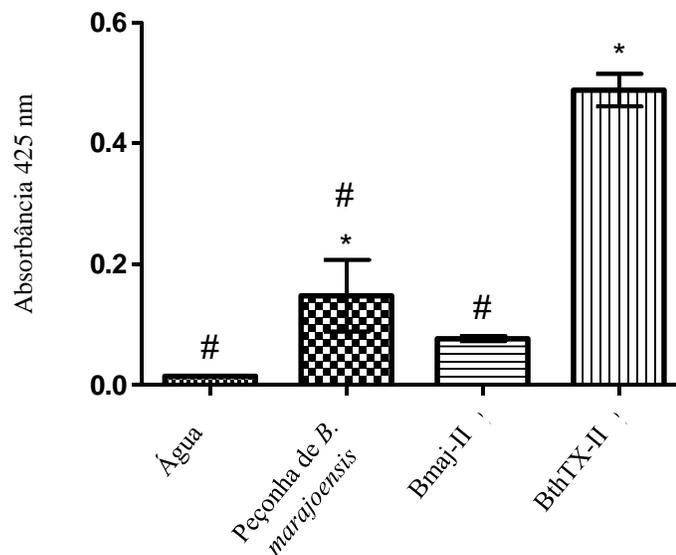
Figura 19: Similaridade da sequência parcial de Bmaj-II e as outras PLA₂s conhecidas da peçonha de *B. marajoensis*

Um *weblogo* apresentando os aminoácidos conservados entre a sequência parcial de Bmaj-II e as outras PLA₂s conhecidas da peçonha de *B. marajoensis*. A altura da letra representa a frequência que o aminoácido aparece entre as sequências naquela posição. As posições com apenas uma letra são aminoácidos conservados entre todas as sequências.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

A avaliação cinética da atividade fosfolipásica da Bmaj-II e a peçonha de *B. marajoensis* foi realizada com os resultados apresentados na **Figura 20**. A peçonha mostrou atividade similar com a observada para a peçonha de *Lachesis muta muta*, estatisticamente diferente que o controle negativo, enquanto a Bmaj-II mostrou apenas atividade residual, perto dos valores do controle negativo. Esses dados em conjunto com o sequenciamento confirmam a caracterização da Bmaj-II como PLA₂ homóloga, enzimaticamente inativa.

Figura 20: Atividade fosfolipásica da peçonha e Bmaj-II de *B. marajoensis*



Atividade fosfolipásica *in vitro* da peçonha e PLA₂ de *B. marajoensis*. Leituras de absorbância em 425 nm foram feitas a cada 30 segundos durante 30 minutos. Água Mili-Q foi utilizada como controle negativo. A PLA₂ Asp49 BthTX-II da peçonha da serpente *B. jararacussu* foi utilizada como controle positivo. * Estatisticamente diferente do controle negativo. # Estatisticamente diferente do controle positivo (BthTX-II). A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA, seguido pelo *pos test* de Tukey com $p < 0,05$.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL

4.4.1 Avaliação de atividade antiparasitária

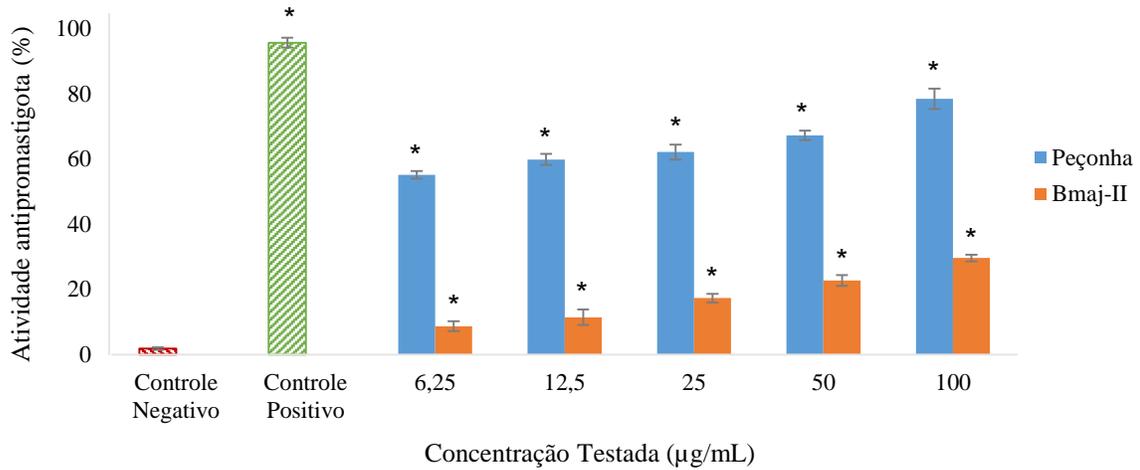
A peçonha de *B. marajoensis* e a Bmaj-II foram submetidas a testes para avaliar a sua atividade antiparasitária *in vitro* sobre formas promastigotas de *Leishmania infantum* e formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. A peçonha apresentou potente atividade antiparasitária sobre ambos de maneira dose-dependente. Bmaj-II mostrou atividade contra *L. infantum* e *T. cruzi* em menor intensidade quando comparada com a peçonha. Especificamente, a peçonha demonstrou atividade anti-leishmania entre 57% e 78% (**Figura 21A**). Bmaj-II mostrou atividade anti-leishmania entre 7% e 29% (**Figura 21A**). A peçonha apresentou atividade contra *T. cruzi* entre 42% e 61% (**Figura 21B**). Finalmente, observou-se atividade contra *T. cruzi* entre 3% e 31% para Bmaj-II nas concentrações de 6,25 a 100 µg/mL, respectivamente (**Figura 21B**).

Nos ensaios contra formas intraeritrocíticas de *Plasmodium falciparum*, observou-se uma inibição de crescimento do parasita significativa para ambos a peçonha de *B. marajoensis* e a Bmaj-II. A concentração de peçonha que inibiu o crescimento do parasita 50% comparado com o controle (IC₅₀) foi de 0,14 µg/mL. A Bmaj-II apresentou um IC₅₀ de 6,41 µg/mL, mostrando uma atividade anti-malárica de menos intensidade que a peçonha (**Tabela 7 e Figura 22**).

4.4.2 Avaliação de atividade citotóxica

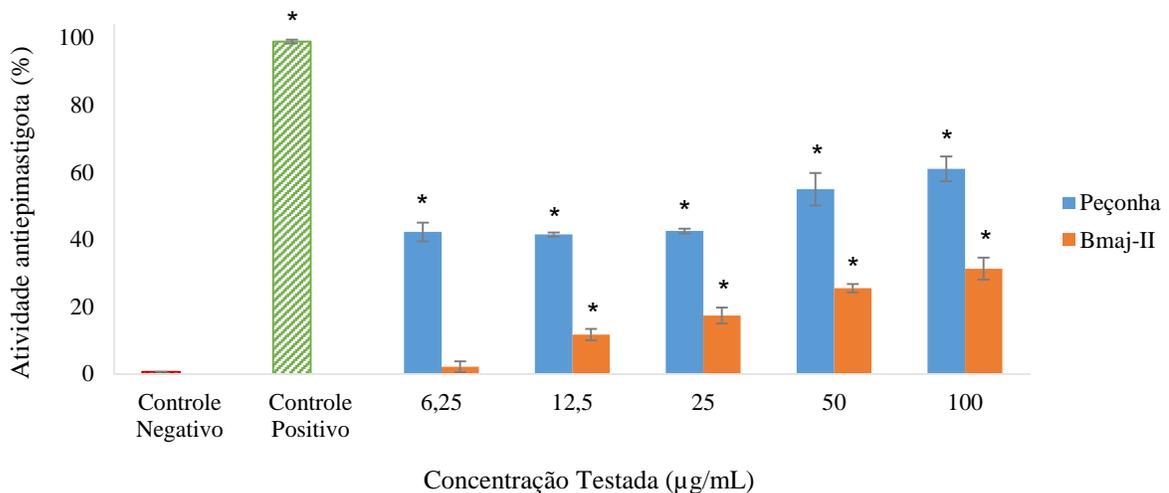
Posteriormente, foram realizados testes de citotoxicidade com a peçonha de *B. marajoensis* e a Bmaj-II contra células hepáticas HepG2, e a partir desses resultados e os resultados dos testes contra *Plasmodium*, calculou-se o índice de seletividade da peçonha e seu isolado. A peçonha teve um efeito citotóxico apresentado como CC₅₀ de 43,64 µg/mL enquanto o CC₅₀ da Bmaj-II contra células hepáticas hospedeiras foi de 53,07 µg/mL (**Tabela 7 e Figura 23**).

Figura 21: Atividade da peçonha e Bmaj-II de *B. marajoensis* contra *L. infantum*



Atividade *in vitro* da peçonha (azul) e PLA₂ (laranja) de *B. marajoensis* contra formas promastigotas de *Leishmania infantum*, MCAN/ES/92/BNC83 em concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL. * Representa uma diferença significativa comparado com o controle negativo ($p < 0,05$). Ambos exibiram atividade antiepiemastigota e antipromastigota, Bmaj-II em menor intensidade, quando comparado com o controle negativo. Como controle negativo utilizou-se meio de cultura. Como controle positivo utilizou-se 100 µg/mL de pentamidina.

Figura 22: Atividade da peçonha e Bmaj-II de *B. marajoensis* contra *T. cruzi*



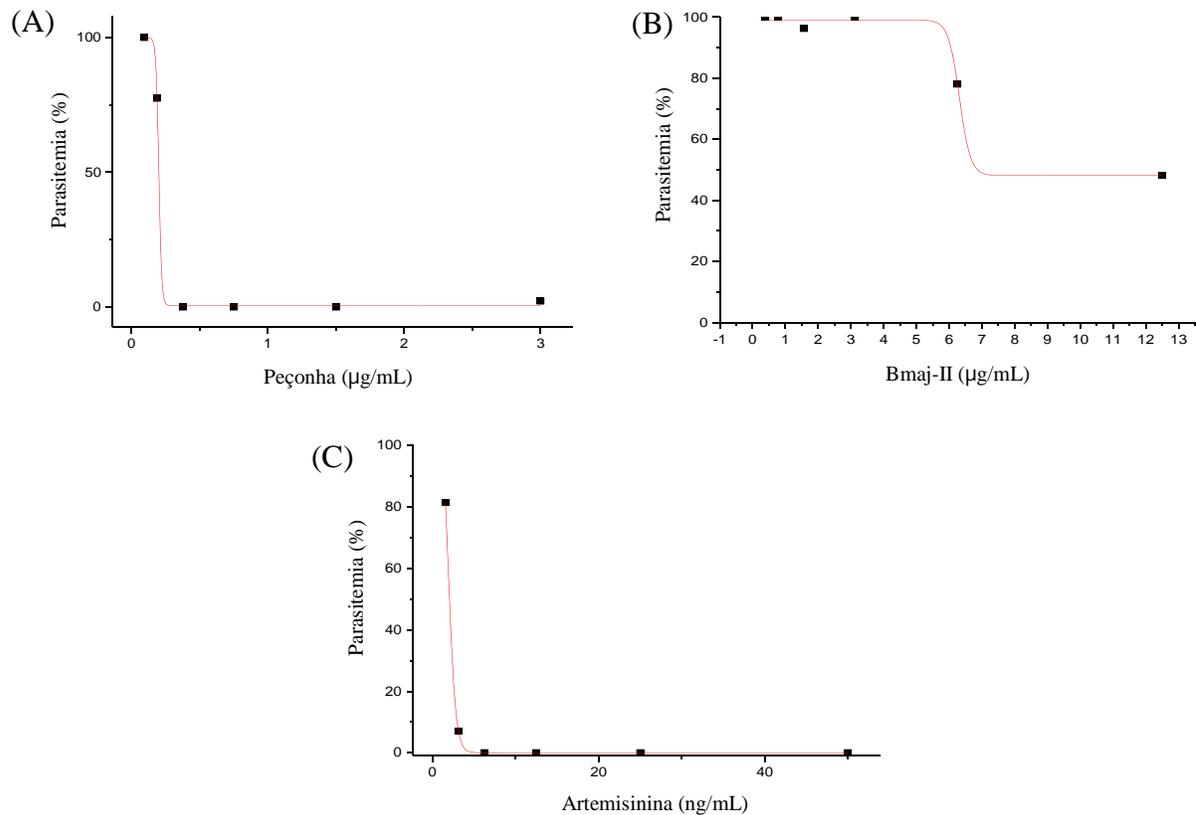
Atividade *in vitro* da peçonha (azul) e PLA₂ (laranja) de *B. marajoensis* contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, Cepa CL-clone B5 em concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL. * Representa uma diferença significativa comparado com o controle negativo ($p < 0,05$). Ambos exibiram atividade antiepiemastigota, Bmaj-II em menor intensidade, quando comparado com o controle negativo. Como controle negativo utilizou-se meio de cultura. Como controle positivo utilizou-se 100 µg/mL de benzonidazol.

Tabela 7: IC₅₀, CC₅₀ e índice de seletividade da peçonha de *B. marajoensis* e da Bmaj-II contra *P. falciparum* e células HepG2

Amostra	IC ₅₀ contra formas intraeritrocíticas de <i>P. falciparum</i> (µg/mL)	R ²	CC ₅₀ contra células hepáticas HepG2 (µg/mL)	R ²	Índice de Seletividade
Peçonha de <i>B. marajoensis</i>	0,14 ± 0,08	0,99	43,64 ± 7,94	0,99	312
Bmaj-II	6,41 ± 0,64	0,97	53,07	1,00	8,28
Artemisinina	0,00253 ± 0,00021	1,00	≥ 1000		≥ 1000

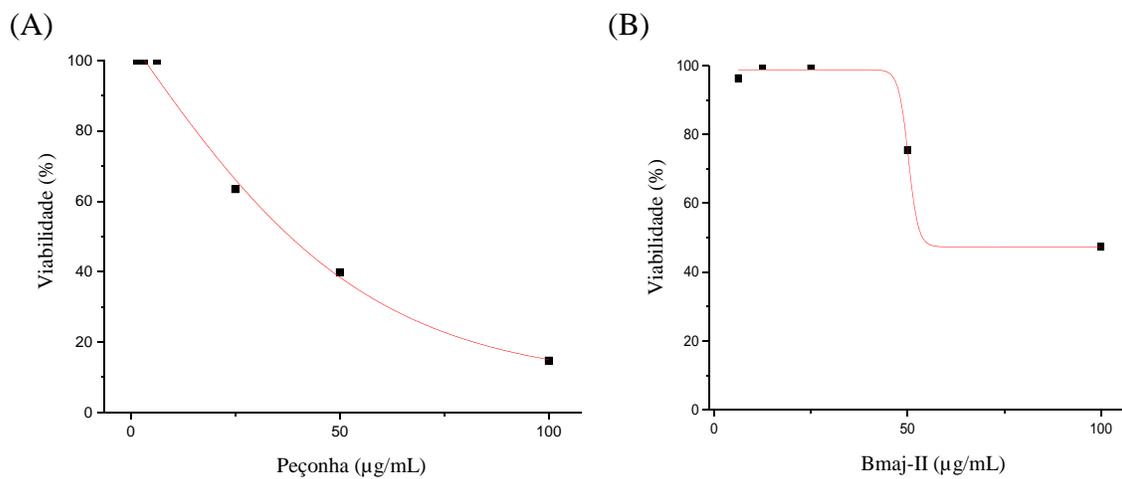
IC₅₀ = Concentração inibidora de 50%; CC₅₀ = Concentração citotóxica de 50%

Figura 23: Atividade antimalárica da peçonha e Bmaj-II de *B. marajoensis*



Representativo das curvas de atividade *in vitro* contra formas intraeritrocíticas de *P. falciparum* de **A**) a peçonha de *B. marajoensis* em concentrações de 0,094, 0,188, 0,375, 0,75, 1,5 e 3,0 µg/mL, e **B**) a Bmaj-II em concentrações de 0,391, 0,781, 1,563, 3,125, 6,25 e 12,5 µg/mL. A artemisinina **(C)** foi utilizada como controle positivo em concentrações de 3,125, 6,25, 12,5, 25 e 50 ng/mL.

Figura 24: Atividade citotóxica da peçonha e Bmaj-II de *B. marajoensis*



Representativo das curvas de atividade *in vitro* contra células hepáticas hospedeiras HepG2 de **A)** a peçonha de *B. marajoensis* e **B)** a Bmaj-II em concentrações de 1,563, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL. A artemisinina foi utilizada como controle positivo (dados não mostrados).

5 DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA PLA₂ BÁSICA DA PEÇONHA DA SERPENTE *B. marajoensis*

Métodos cromatográficos são usualmente a abordagem mais utilizada para o fracionamento e purificação de componentes de peçonhas de serpentes. Na escolha do método cromatográfico a ser empregado, objetivando obtenção de maior rendimento e alto grau de pureza, diversos aspectos devem ser avaliados, entre eles: o tipo de resina, o tamanho da coluna, o fluxo, e o gradiente dos tampões empregados. Esses parâmetros são escolhidos em função das características estruturais e físico-químicas da molécula a ser isolada, ou previstas a partir da similaridade com outras moléculas já purificadas, que são levadas em consideração para a definição das etapas e condições cromatográficas que serão úteis no processo de purificação (STÁBELI et al., 2012).

Vários estudos mostram que a cromatografia de troca catiônica é um método eficaz no isolamento de PLA₂s de peçonhas de serpentes, em especial as PLA₂s básicas. Em uma cromatografia de troca iônica, o tempo de retenção das amostras na coluna depende de diferenças em sua carga total, ao qual pode ser inferida pelo ponto isoelétrico (KASTNER, 1999). Spencer e colaboradores (1998) mostraram o isolamento da toxina BthTX-I, uma PLA₂ básica da peçonha de *Bothrops jararacussu*, utilizando apenas uma etapa de cromatografia de troca catiônica. Nesse estudo foi utilizada uma coluna de troca catiônica Resource-S (*GE Healthcare Lifescience*) em um sistema de FPLC e eluída com um gradiente linear salino. Em sua maioria, outros estudos realizaram etapas adicionais além da troca catiônica, como cromatografia de filtração em gel ou fase reversa (MARUÑAK et al., 2007; KHOW et al., 2003).

Até o presente momento, a literatura descreve quatro PLA₂s purificadas da peçonha de *B. marajoensis* (**Tabela 8**). Ponce-Soto e colaboradores (2010) desenvolveram um trabalho no qual duas PLA₂s básicas denominadas BmjeTX-I e BmjeTX-II, foram purificadas após duas etapas cromatográficas: troca iônica seguida por fase reversa. As duas PLA₂s isoladas apresentaram alto grau de identidade com outras PLA₂s Asp49 básicas de outras peçonhas de serpentes do mesmo gênero (**Apêndice A**).

Tabela 8: Comparação de estratégia de purificação, massa molecular, pI e atividade enzimática de PLA₂s isoladas da peçonha da serpente *B. marajoensis*

Nome da PLA ₂	Massa Molecular	pI	Atividade Fosfolipásica	Estratégia de Purificação	Referência
Bmaj-II	13.956 Da	9,68	Lys49	CM Sepharose (troca catiônica), C18 <i>Discovery</i> (fase reversa)	Presente trabalho
Bmaj-9	13.679 Da	8,55	Asp49	μ-Bondapak C-18 (Fase reversa)	GALBIATTI et al., 2012
BmjeTX-I	13.808 Da	8,12	Asp49	Protein Pack SP 5PW (troca aniônica), C18 μ- Bondapak (fase reversa)	PONCE-SOTO et al., 2010
BmjeTX-II	13.863 Da	8,24	Asp49	Protein Pack SP 5PW (troca aniônica), C18 μ- Bondapak (fase reversa)	PONCE-SOTO et al., 2010
BmarPLA ₂	~14 kDa*	ND	Lys49	Protein Pack SP 5PW (troca aniônica), C-18 X-Terra (fase reversa)	COSTA TORRES et al., 2010

*SDS-PAGE; ND=não determinado

Uma outra PLA₂ básica de *B. marajoensis*, nomeada BmarPLA₂, foi caracterizada em dois estudos diferentes (EVANGELISTA et al., 2010; COSTA TORRES et al., 2010). Ambos os estudos utilizaram uma etapa de cromatografia de troca iônica com uma metodologia similar com aquela do presente trabalho, seguida de uma cromatografia de fase reversa em uma coluna C18 como segunda etapa na purificação da PLA₂. A eluição na coluna aconteceu com um gradiente não-linear do tampão B (ACN 66,6% + TFA 0,1%). A fosfolipase isolada apresentou um alto grau de similaridade com outras PLA₂s Lys49 básicas de peçonhas botrópicas (**Apêndice B**).

A quarta PLA₂ de *B. marajoensis* foi caracterizada por Galbiatti e colaboradores (2012), o qual mostrou alta similaridade com BmjeTX-I e BmjeTX-II, nomeada Bmaj-9 (**Apêndice C**). Porém, o isolamento constituiu de apenas uma etapa de cromatografia de fase reversa. Para a purificação desta toxina, apenas 10 mg de peçonha de *B. marajoensis* foram aplicados a uma coluna C-18, rendendo uma pequena quantidade da PLA₂ em questão.

Portanto, no presente estudo, para o isolamento de uma nova fosfolipase A₂ básica da peçonha de *B. marajoensis*, foi utilizada inicialmente uma cromatografia de troca catiônica com

uso de uma coluna CM-Sepharose (**Figura 9**) onde foram obtidos 11 frações cromatográficas que apresentaram em sua maioria bandas na faixa de 14 kDa, que são compatíveis com a presença de svPLA_{2s}. O décimo primeiro pico apresentou uma banda intensa na faixa de massa aparente de 14 kDa, com a presença de outras bandas de menor intensidade de aproximadamente 30 a 150 kDa (**Figura 10**), ao qual foi submetido a uma cromatografia de fase reversa em coluna C18, resultando em um pico majoritário acompanhado de outros picos pequenos residuais (**Figura 11A**). A fim de se obter a proteína de 14 kDa em alto grau de pureza, o pico majoritário foi coletado e recromatografado em fase reversa nas mesmas condições anteriores, resultando em um pico majoritário acompanhado de um segundo pico de menor intensidade, apresentando resolução de 100% (**Figura 11B**).

A partir da Bmaj-II com alto grau de pureza foi possível realizar sua caracterização bioquímica. O ponto isoelétrico foi determinado por eletroforese bidimensional, sendo obtido valor de 9,68 (**Figura 13**), o qual é compatível com os observados em outras fosfolipases já descritas da mesma peçonha de serpente (**Tabela 8**).

A maioria das PLA_{2s} isoladas de peçonhas botrópicas já descritas são proteínas básicas, com ponto isoelétrico entre 7 a 10, mostrando a presença ou ausência de atividade catalítica, miotóxica, edematogênica e anticoagulante (DOS SANTOS et al., 2009). No geral, as PLA_{2s} ácidas demonstram uma atividade catalítica maior do que suas isoformas básicas (STÁBELI et al., 2012). Resíduos de arginina e lisina na superfície das PLA_{2s} podem ser relacionados com várias características dessa proteína. Por exemplo, a interação entre os resíduos básicos na superfície de ligação com vesículas aniônicas desempenha um papel importante na ligação interfacial com membranas fosfolipídicas aniônicas (WINGET et al., 2006). Também, é proposto que uma concentração de resíduos básicos na superfície de algumas PLA_{2s} é responsável por sua atividade antibacteriana (WEINRAUCH et al., 1998).

Outros estudos mostram que a atividade anticoagulante de algumas PLA_{2s} de mamíferos, tais como GIIA, GIID, GV sPLA_{2s}, além de várias sPLA_{2s} de peçonhas de serpentes, é dependente de muitos resíduos básicos na superfície dessas proteínas, aparentemente por estar relacionado à inibição da atividade da protrombinase por meio da ligação ao fator Xa (KINI, 2005). Stábeli e colaboradores (2006) mostraram que a acetilação de resíduos de Lys em PLA_{2s}, reduzindo a característica básica dessas moléculas, afetou os efeitos das PLA_{2s}, tais como citotoxicidade, miotoxicidade e letalidade, indicando a potencial importância da basicidade da molécula nessas

atividades. Esses efeitos farmacológicos, que geralmente são mais potentes em PLA₂s com pI alcalino que nas com pI neutro ou ácido, podem ser relacionados com as cargas positivas na superfície da molécula.

O valor da massa da PLA₂ isolada identificada por espectrometria de massa confirma a massa relativa visualizada no gel de eletroforese monodimensional (**Figura 12**) e bidimensional (**Figura 13**), sendo similar com as outras fosfolipases A₂ descritas da peçonha de *B. marajoensis* (**Tabela 8**). A massa molecular de 13.956 Da da PLA₂ isolada (**Figura 14**) é similar às da peçonha de outros membros da família Viperidae, sendo para esta família, descritas com valor de massa molecular entre 13 a 18 kDa (FAURE e SAUL, 2011).

A Bmaj-II apresenta uma tendência à formação de oligômeros, observado tanto nos experimentos de eletroforese (mono e bi-dimensionais) quanto de espectrometria de massa, onde se pode verificar além da estrutura monomérica (14 kDa), a presença de formas multiméricas (dímeros, trímeros, tetrâmeros e pentâmeros da PLA₂). Necessitou-se realizar outras técnicas para a melhor compreensão e verificação dessa oligomerização.

O espalhamento de luz dinâmico pode fornecer preciosas informações sobre as propriedades de macromoléculas, incluindo coeficientes de difusão, suas dimensões, a massa molecular e propriedades de associação e dissociação. A partir da difusão translacional (D_T) é possível se obter informações sobre o tamanho de macromoléculas em solução (R_H) a partir da equação de Stokes-Einstein: $D_T = (k_B \cdot T) / (6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_H)$, onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, η é a viscosidade da solução (HOFMANN, 2010). Além disso, a partir do R_H é possível se obter uma estimativa da massa molecular da molécula utilizando-se a curva de calibração de proteínas globulares de massa conhecida (FERRÉ-D'AMARÉ e BURLEY, 1997).

No trabalho atual, observou-se formas diméricas e tetraméricas da Bmaj-II, em concentrações de 1 e 2 mg/mL, respectivamente, em ensaios de espalhamento de luz dinâmico (**Tabela 5 e 6**). Esse comportamento não é comumente observado em PLA₂s de peçonhas de serpentes, restando poucos relatos descritos a seguir.

Vários pesquisadores descrevem que as svPLA₂s existem apenas em formas monoméricas ou diméricas dentro de concentrações e condições similares à fisiológica. A oligomerização, de acordo com esses autores, pode acontecer em concentrações altas da toxina, ou quando estão interagindo com um substrato fosfolípido, agindo em sinergia para uma ação enzimática mais eficiente (FREMONT et al., 1993; LOK et al., 2005; KANG et al., 2011).

Há alguns estudos que sugerem que as formas triméricas ou pentaméricas de uma PLA₂ podem ser induzidas por outros fatores. Por exemplo, a PLA₂ neurotóxica da peçonha de *Trimeresurus mucrosquamatus*, chamada trimucrotoxina, apareceu como um trímero em ensaios de eletroforese em condições não redutoras, na presença de Ca²⁺ ou Sr²⁺ (TSAI et al., 1995). Sugere-se uma agregação de menor intensidade comparado com a Bmaj-II do presente trabalho, o qual formou múltiplas agregações sem a presença de íons e em condições redutoras e não redutoras de SDS-PAGE.

Além disso, a oligomerização pode ser vista em ensaios de cristalografia de raio X. Até 2005, foram descritas três estruturas de PLA₂s com forma cristalizada trimérica: uma isolada da peçonha de *Naja naja naja* (SEGELKE et al., 1998), outra isolada de *N. naja kaouthia* (GU et al., 2002), e a última de *Bungarus caeruleus* (SINGH et al., 2004). Alguns desses autores afirmam que a oligomerização de PLA₂s pode ser atribuída a sua inativação na peçonha para armazenamento de longo prazo, ou para gerar uma nova função da PLA₂, ou também para criar um complexo mais letal da molécula.

Outra fosfolipase que exibiu agregações comparáveis com as de Bmaj-II foi uma PLA₂ homóloga isolada da peçonha da serpente *B. moojeni* (MjTX-I) a qual exibiu formas monoméricas, diméricas, triméricas, tetraméricas e pentaméricas observadas em gel de eletroforese monodimensional, dependendo da presença ou ausência de agentes redutores (SOARES, 2000). Essa toxina mostra uma tendência notável à oligomerização, e em solução com variações de pH, apresentou formas de monômeros, dímeros, e tetrâmeros. De acordo com Salvador e colaboradores (2013), a MjTX-I foi a primeira PLA₂ Lys49 a apresentar este comportamento. Com ensaios de cristalografia, espalhamento de luz dinâmico, espalhamento de raios-X a baixo ângulo, entre outros, observou-se uma forma cristalizada tetramérica dessa toxina e oligomerizações variadas perto de condições fisiológicas. Os autores concluem que em termos de evolução, essas formas oligoméricas podem ser associadas ao surgimento de novas funcionalidades da MjTX-I.

Por esta ser uma caracterização preliminar da Bmaj-II, investigações mais profundas serão necessárias para melhor elucidar sua oligomerização. Tais investigações podem incluir técnicas de cristalização da proteína, análise por raio-X, modelagem tridimensional, entre outras. A equipe de Faure, Xu e Saul (2011) utilizaram algumas dessas técnicas para resolver a estrutura tridimensional da crotoxina, uma neurotoxina heterodimérica da serpente *Crotalus durissus terrificus*, e exatamente quais resíduos de aminoácidos nas duas subunidades do dímero são regiões de contato

para a estabilidade e função do complexo crotoxina. Uma caracterização nesse nível de detalhe ajudaria compreender o mecanismo de ação da Bmaj-II, e a importância de sua oligomerização. Vale a pena ressaltar que a determinação de quais aminoácidos possam ser manipulados para modificar as ações farmacológicas da proteína é extremamente útil para futuros estudos em engenharia de proteína.

5.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

Com o uso das técnicas de sequenciamento por degradação de Edman e *de novo* por espectrometria de massa, foi possível identificar aproximadamente 80% da sequência primária da Bmaj-II. O alinhamento múltiplo comparado a outras PLA₂s revelou evidências que corroboram a afirmação de que a Bmaj-II é uma PLA₂ inédita. Ela apresentou 95% de similaridade com a miotoxina Myo-II da peçonha da serpente *Bothrops diporus* e 89-91% similaridade com outras PLA₂s de *B. brazili*, *B. asper*, *B. jararacussu*, *B. pauloensis* e *B. pirajai* (**Figura 16; Figura 17; Figura 18; Figura 19; Tabela 9**). Todas essas proteínas apresentam o aminoácido lisina na 49^a posição da sequência, sendo classificadas como homólogas de fosfolipases A₂ Lys49, não apresentando atividade fosfolipásica, ao contrário de fosfolipases A₂ enzimaticamente ativas que apresentam o aminoácido aspartato na 49^a posição. Devido à identidade com outras PLA₂s homólogas Lys49 e à ausência de atividade catalítica (**Figura 20**), propomos que a Bmaj-II também seja uma PLA₂ homóloga Lys49.

As fosfolipases A₂ são classificadas em cataliticamente ativas ou “clássicas” e cataliticamente inativas ou “variantes”, baseado na presença do aminoácido aspartato na posição 49 ou uma lisina na posição 49, respectivamente. As PLA₂s Asp49 ativam uma molécula de água estruturalmente conservada a qual inicia um ataque nucleofílico sobre a posição *sn*-2 no substrato (WARD et al., 2002). Porém, uma lisina na posição 49 interfere no centro catalítico da molécula e também indica que há substituições de outros aminoácidos na alça que liga ao cálcio. Essas mudanças fazem bastante diferença nas características da proteína, pois PLA₂s Asp49 são cataliticamente ativas e as Lys49 são cataliticamente inativas, e por isso são chamadas de “PLA₂s-like” ou PLA₂s homólogas (MORA-OBANDO et al., 2014). Entretanto, mesmo na ausência de atividade enzimática, as PLA₂s Lys49 frequentemente possuem efeitos farmacológicos independentes de cálcio como miotoxicidade por meio da indução de mionecrose, citotoxicidade

por danificação da membrana celular e atividade antiparasitária, entre outros. A hipótese atual é que há vários resíduos de aminoácidos hidrofóbicos perto do C-terminal da PLA₂ que se submetem a uma mudança conformacional e interagem com o sítio ativo (AMBROSIO et al., 2004; MOURA et al., 2014).

Tabela 9: Grau de similaridade entre as sequências de PLA₂s Lys49 ou Asp49 comparado com a sequência parcial de Bmaj-II

Espécie de Origem	Nome da Toxina	Resíduo 49 da PLA ₂	Similaridade a sequência parcial da Bmaj-II
<i>Bothrops marajoensis</i>	Bmaj-II	Lys49	100%
<i>B. diporus</i>	Myo-II	Lys49	95%
<i>B. brazili</i>	MTX-II	Lys49	91%
<i>B. asper</i>	MtxII	Lys49	90%
<i>B. jararacussu</i>	BthTX-I	Lys49	90%
<i>B. pauloensis</i>	Bnsp-7	Lys49	90%
<i>B. pirajai</i>	PrTX-II	Lys49	89%
<i>B. pirajai</i>	PrTX-I	Lys49	89%
<i>B. marajoensis</i>	BmarPLA ₂	Lys49	82%
<i>B. marajoensis</i>	Bmaj-9	Asp49	72%
<i>B. marajoensis</i>	BmjeTX-I	Asp49	67%
<i>B. marajoensis</i>	BmjeTX-II	Asp49	66%

Além da sequência de aminoácidos de uma proteína, as estruturas secundárias revelam informações importantes sobre a mesma. A técnica de espectroscopia de dicroísmo circular é principalmente utilizada para elucidar a estrutura secundária de macromoléculas, também sendo útil para verificar mudanças em estruturas de proteínas durante interações com outras moléculas ou para observar similaridade entre uma proteína e sua forma recombinante (NAKANISHI, BEROVA, WOODY, 1994). Essa técnica é baseada na diferença de absorção entre uma radiação

incidente circularmente polarizada à esquerda e a radiação circularmente polarizada à direita por moléculas opticamente ativas, como por exemplo, as proteínas, devido ao carbono α assimétrico dos aminoácidos. Essa absorção diferencial provoca uma mudança no sentido do vetor resultante, que de circularmente polarizado passa a se tornar elipticamente polarizado (HOFMANN, 2010).

No presente estudo, a espectroscopia de dicroísmo circular foi utilizada para a avaliação de sua estrutura secundária. Deste modo, as α -hélices possuem transições eletrônicas nos comprimentos de onda 190-195 nm e 208-210 nm e uma transição eletrônica no comprimento de onda 222 nm. As β -folhas possuem uma transição eletrônica no comprimento de onda 195-200 nm e uma no comprimento de onda 215-220 nm. Ainda, os elementos desordenados possuem uma transição eletrônica no comprimento de onda 200 nm e uma de baixa energia no comprimento de onda 220 nm (KELLY et al., 2005).

O padrão de elipsidade da Bmaj-II revelou 45% de sua estrutura secundária composta por alfa hélices, e 15% de folha beta, um padrão característico de fosfolipases A₂ (DIZ FILHO et al., 2008) (**Figura 15**). Outras diversas PLA₂s de peçonhas botrópicas descritas na literatura apresentaram perfis de dicroísmo circular semelhantes à Bmaj-II, tais como a PrTX-III da peçonha de *B. pirajai* e BthTX-I da peçonha de *B. jararacussu* (XIMENES et al., 2012; SÁ et al., 2004).

5.3 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL

Vários estudos já foram publicados mostrando as características de diversas PLA₂s de peçonhas botrópicas e outros gêneros de serpentes como agentes antiparasitários, com resultados variáveis. Esses estudos investigaram os efeitos das peçonhas e suas PLA₂s contra *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium* spp., e células hospedeiras HepG2. O presente trabalho investigou questões semelhantes para a peçonha e PLA₂ isolada da *B. marajoensis*. A peçonha de *B. marajoensis* apresentou 57% de atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *Leishmania infantum* na concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$, alcançando 78% na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, no entanto a Bmaj-II exibiu 7% e 29% nas mesmas concentrações (**Figura 21**).

Os resultados obtidos foram similares ao observado para outras fosfolipases A₂ de peçonhas de outras serpentes, enquanto os resultados publicados para as PLA₂s de *B. marajoensis* até o presente momento divergiram do observado no presente trabalho. Stábeli e colaboradores (2006) avaliaram a atividade antiparasitária da MjTX-II, uma PLA₂ Lys49 homóloga isolada da peçonha

de *B. moojeni*, contra formas promastigotas de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani*, e *L. major*), que foi avaliada nas concentrações de 5, 25, e 75 µg/mL mostrando atividade anti-leishmania de 9-15%, 18-37%, e 32-58%, respectivamente, variando com a espécie de *Leishmania* utilizada. Esses resultados foram parecidos com aqueles observados para as PLA₂s MTX-I e MTX-II da peçonha da serpente *B. brazili* contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (COSTA et al., 2008). A MjTX-II e a MTX-II, assim como a Bmaj-II, são PLA₂s homólogas Lys49 enzimaticamente inativas, sugerindo que o mecanismo de ação contra as células de *Leishmania* é independente da atividade catalítica.

A hipótese atual desse mecanismo de ação é relacionado com a região C-terminal das proteínas, ricas em aminoácidos hidrofóbicos e básicos, ao qual postula-se que possam ser capazes de promover uma perturbação nas membranas celulares independente da atividade catalítica. Isto enfraquece a membrana e a deixa vulnerável a outras mudanças (LOMONTE et al., 2010). Essa hipótese é corroborada pelo estudo feito por Costa e colaboradores (2008) no qual produziram peptídeos sintéticos, ativos contra *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, baseado nos aminoácidos 115-129 da região C-terminal das PLA₂s MTX-I e MTX-II. Apesar que a primeira é enzimaticamente ativa e a segunda é inativa, os peptídeos produzidos mostraram um efeito antiparasitário muito semelhante entre eles.

Moura e colaboradores (2014) publicaram um estudo comparativo da atividade antiparasitária da peçonha e de três PLA₂s isoladas de *B. matto grossensis*, BmatTX-I, BmatTX-II, e BmatTX-III, por meio de um ensaio contra formas promastigotas de *L. amazonensis*. Utilizando um método praticamente idêntico ao do presente estudo, observou-se atividade anti-leishmania de aproximadamente 58% e 80% para as concentrações de 6,25 e 100 µg/mL de peçonha de *B. matto grossensis*. Os ensaios antiparasitários com as PLA₂s isoladas mostraram valores inferiores de atividade leishmanicida em comparação com a Bmaj-II do presente estudo, observando-se 16% a 25% de atividade anti-leishmania nas mesmas concentrações. Uma comparação da atividade anti-leishmania alta da peçonha e a atividade menor das PLA₂s sugere que há outros componentes presentes na peçonha que contribuem para a toxicidade ao parasita.

Adicionalmente, uma PLA₂ básica isolada da peçonha de *B. pauloensis*, a BnSP-7, interferiu com a proliferação, estrutura e infetividade de *L. amazonensis*. Observou-se inibição de proliferação de formas promastigotas entre 60 a 70% para as concentrações testadas entre 50 a 200 µg/mL após 96 horas de incubação, uma potência maior do que foi observada com a Bmaj-II no

presente estudo. Os autores também observaram mudanças morfológicas no nível celular das promastigotas, inclusive alterações nas mitocôndrias, núcleos, membrana celular, entre outras, que podem esclarecer os mecanismos de ação envolvidos (NUNES et al., 2013).

Porém, há um estudo com diferenças notáveis nos resultados observados comparado com o presente trabalho. Costa Torres e colaboradores (2010) testaram a peçonha de *B. marajoensis*, sua BmarLAAO e BmarPLA₂ contra formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis*. Enquanto observaram-se atividade leishmanicida significativa para ambas a peçonha e a BmarLAAO, nenhuma atividade antiparasitária foi observada para a BmarPLA₂. Isso pode parecer contraditório aos resultados do presente trabalho, uma vez que a BmarPLA₂ é caracterizada como cataliticamente inativa, assim como a Bmaj-II, e vem da mesma peçonha de serpente. Porém as concentrações da fração testada contra as espécies de *Leishmania* foram de 0,39 – 6,25 µg/mL, quantidades inferiores às aquelas testadas com a Bmaj-II.

Peichoto e colaboradores (2011) investigaram a atividade leishmanicida de cinco peçonhas de serpentes contra promastigotas de *L. major*, encontrando graus variáveis de inibição de crescimento. A peçonha de *Trimorphodon biscutatus lambda* destaca-se por apresentar uma inibição de crescimento em concentrações altas enquanto em concentrações intermediárias, a peçonha induziu proliferação do parasita. Uma PLA₂ isolada da mesma peçonha, a trimorfina, apresentou alta inibição do crescimento da *Leishmania* com um IC₅₀ de 3,6 µg/mL. A trimorfina em concentrações baixas também induziu proliferação dos parasitas ao invés de inibir.

Passero e colaboradores (2007) testaram peçonhas de três subespécies de *Crotalus durissus* contra promastigotas de *L. amazonensis*. Enquanto a peçonha da serpente *Crotalus durissus cascavella* apresentou uma forte atividade leishmanicida (IC₅₀ de 9,4 µg/mL), sua crotoxina isolada, composto por uma subunidade ácida proteica (CA) e uma PLA₂ básica (CB), mostrou uma fraca atividade leishmanicida (IC₅₀ de 99,80 µg/mL). Adicionalmente, os autores encontraram outros componentes da peçonha com maior atividade leishmanicida, tais como a giroxina e a crotamina.

A avaliação da atividade antiparasitária contra formas epimastigotas de *T. cruzi* pela peçonha de *B. marajoensis* apresentou 42% a 61% de atividade tripanocida nas concentrações de 6,25 a 100 µg/mL, sendo que a Bmaj-II apresentou 3% a 31% nas concentrações de 6,25 a 100 µg/mL, o que também sugere a participação de outros componentes na atividade antiepigastigota da peçonha (**Figura 22**).

Os estudos abordando a atividade tripanocida de svPLA₂s são escassos, além de um estudo em que nenhuma atividade tripanocida foi encontrada para as PLA₂s testadas da peçonha de *B. leucurus* e *B. marajoensis* (TORRES et al., 2009), sendo mais frequente a avaliação da peçonha e outras enzimas como LAAOs contra *T. cruzi*. Fernandez-Gomez e colaboradores (1994) desenvolveram um dos primeiros estudos realizados mostrando que as peçonhas de *Cerastes cerastes* e *Naja haje* exerceram inibição de crescimento sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. d. infantum*. Nesse estudo, comprovaram que depois do aquecimento dessas peçonhas, estas perderam atividade antiparasitária, sugerindo que os componentes responsáveis são termolábeis.

Em outro estudo desenvolvido por Castillo-Vigil e colaboradores (2008), investigou-se a atividade tripanocida da peçonha das serpentes *Atropoides nummifer*, *Atropoides picadoi*, *Bothrops asper*, *Bothriechis schlegelii* e *Crotalus durissus durissus* contra as formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas de duas cepas de *T. cruzi*, onde todas as peçonhas exibiram atividade tripanocida, diminuindo a viabilidade de ambas as cepas de *T. cruzi* testadas, com vários graus de eficácia. Utilizando uma cepa CL, assim como no presente estudo, as peçonhas mostraram atividade contra formas epimastigotas de *T. cruzi* de aproximadamente 50% para todos os venenos testados depois de 72 horas de incubação na concentração de 40 µg/mL. Esses valores corroboram os dados encontrados com a utilização da peçonha de *B. marajoensis* no presente estudo.

Merece destaque o potencial antiparasitário da peçonha de *B. jararaca* contra formas epimastigotas, amastigotas, e tripomastigotas de *T. cruzi* e formas promastigotas de *L. major*. Gonçalves e colaboradores (2002) mostraram uma correlação negativa entre a concentração da peçonha e o crescimento dos parasitas, provavelmente relacionado com mudanças ultraestruturais nas mitocôndrias e cinetoplastos observadas nas células dos parasitas após tratamento com a peçonha. Neste estudo observou-se 50% de inibição de crescimento de ambos os parasitas com concentrações de 0,1-0,3 µg/mL da peçonha e 100% de inibição de crescimento em uma concentração de 100 µg/mL, uma potência antiparasitária maior do que a de *B. marajoensis* explorada no presente trabalho.

Porém, Deolindo e colaboradores (2005) observaram 50% de inibição de crescimento de *T. cruzi* com uma concentração de 10 µg/mL de peçonha de *B. jararaca*. Também observaram-se condensação do citoplasma, perda do potencial de membrana mitocondrial, aumento da exposição de fosfatidilserina na membrana do plasma seguido por permeabilização, e fragmentação do DNA

em epimastigotas ao longo de um período de 24 h de tratamento com a peçonha, sugerindo uma morte celular programada induzida pela peçonha de serpente.

Um outro trabalho destacou a eficácia da peçonha de *Crotalus viridis viridis* contra todas as formas de desenvolvimento de *T. cruzi*. Neste estudo, utilizou-se um modelo *in vitro* aplicando a peçonha em células LLC-MK2 previamente infectadas com *T. cruzi*. Observou-se uma redução de 76-93% de parasitas por célula depois de 96 horas de incubação. Isto também foi causado por alterações ultraestruturais das células parasitárias, edema das mitocôndrias, vesiculação e ruptura da membrana plasmática, a perda de componentes citoplasmáticos e modificações morfológicas da célula (ADADE et al., 2011).

Apesar de haver apenas um trabalho investigando a atividade tripanocida das PLA₂s de peçonhas de serpentes disponível na literatura (TORRES et al., 2009; COSTA TORRES et al., 2010), outros componentes dessas peçonhas vêm sendo investigados. Observou-se potencial antiparasitário contra tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. amazonensis* para uma proteína secretora rica em cisteína de peçonha de serpente (CRISP) denominada crovirin da serpente *Crotalus viridis viridis* (ADADE et al., 2014). Costa e colaboradores (2015) mostraram o efeito antiparasitário significativo de CR-LAAO, uma L-aminoácido oxidase da peçonha da serpente *Calloselasma rhodostoma*, contra *Leishmania sp.* e *T. cruzi*.

Como foi citado anteriormente, estudos investigando a atividade tripanocida de PLA₂s de peçonhas de serpentes são escassos. Mas é interessante destacar um estudo utilizando PLA₂s de peçonha da abelha *Apis mellifera* contra *Trypanosoma brucei brucei* em que os autores concluíram que as fosfolipases podem desempenhar um papel no aumento dos níveis de endotoxina na tripanossomíase, corroborando o presente trabalho (BOUTRIN; FOSTER; PENTREATH, 2008).

A avaliação da atividade antiparasitária contra formas intraeritrocíticas de *P. falciparum* pela peçonha de *B. marajoensis* apresentou um IC₅₀ de $0,14 \pm 0,08$ µg/mL com CC₅₀ contra células HepG2 de $43,64 \pm 7,94$ µg/mL, revelando um índice de seletividade de 312. A Bmaj-II apresentou um IC₅₀ de $6,41 \pm 0,64$ µg/mL contra *P. falciparum* e CC₅₀ de $53,07$ µg/mL contra células HepG2, calculando-se um índice de seletividade de 8,28 (**Tabela 7; Figura 23; Figura 24**). Na busca de bioativos para o desenvolvimento de novas drogas, é desejado um índice de seletividade superior a 10 para ser considerado potencialmente seguro e drugável (BÉZIVIN et al., 2003). Estudos de mutação sítio dirigida da Bmaj-II podem resultar em um melhor índice de seletividade.

Três estudos investigaram a atividade antiplasmodial de peçonhas de serpentes e suas PLA₂s com resultados parecidos com os achados do presente trabalho. Terra e colaboradores (2015) encontraram um IC₅₀ de 0,78 µg/mL para a peçonha de *Micrurus spixii* contra formas eritrocíticas de *P. falciparum in vitro*. O efeito antimalárico contra *P. falciparum* da peçonha de *Bothrops asper*, uma de suas PLA₂s Asp49, e uma PLA₂ homóloga Lys49 foi apresentado por Castillo e colaboradores (2012), com valores de IC₅₀ de 0,13 µg/mL, 1,42 µg/mL e 22,89 µg/mL, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Quintana e colaboradores (2012) para a peçonha de *Crotalus durissus cumanensis* e suas duas PLA₂s com valores de IC₅₀ de 0,17 µg/mL, 0,76 µg/mL, e 0,60 µg/mL respectivamente, afirmando a intensa atividade antiplasmodial dessas moléculas.

Desses estudos, todos também testaram a citotoxicidade das peçonhas e seus isoladas contra células do hospedeiro para calcular o índice de seletividade dos mesmos em relação à malária. Especificamente, uma PLA₂ homóloga Lys49 da peçonha de *B. asper* apresentou atividade citotóxica em células sanguíneas periféricas mononucleares com um CC₅₀ de 67,43 ± 1,03 µg/mL e um índice de seletividade de 2,95 em relação à malária, mostrando uma citotoxicidade maior contra células hospedeiras e menor contra *Plasmodium* (CASTILLO et al., 2012) do que a Bmaj-II, isolada de *B. marajoensis* no presente trabalho.

Quintana e colaboradores (2012) mostraram a relação entre atividade hemolítica, por meio de um ensaio de hemólise indireta, e atividade antiplasmodial. No caso, a fração da peçonha de *Crotalus durissus cumanensis* sem atividade hemolítica, indicando que não possui atividade fosfolipásica, mostrou menor atividade anti-malárica (IC₅₀=48,36 ± 16,16 µg/mL) e menor índice de seletividade (1,19) comparado com as outras frações hemolíticas da peçonha, em relação a células sanguíneas periféricas mononucleares do hospedeiro. Concluiu-se que a habilidade de toxinas de liberar ácidos graxos livres e lisofosfolípidos pela ação enzimática pode ser responsável por sua atividade antiplasmodial. Porém, a Bmaj-II, uma PLA₂ enzimaticamente inativa, objeto desse estudo, mostrou uma atividade contra *Plasmodium* e um índice de seletividade comparável com algumas PLA₂s enzimaticamente ativas estudadas por Quintana e colaboradores (2012) e Castillo e colaboradores (2012).

O estudo de Zieler e colaboradores (2001) que investigaram os efeitos antimaláricos de PLA₂s se destaca por utilizar os oocinetos de *P. falciparum* e *P. gallinaceum*, uma forma do parasita apenas observada dentro do vetor. Observaram-se que PLA₂s de peçonhas da abelha produtora de

mel, e das serpentes *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus adamanteus*, *Naja mossambica mossambica* e *Naja naja* impediram a interação dos oocinetos com o intestino do vetor, mesmo na presença de um inibidor de PLA₂. Porém, essas PLA₂s não mostraram nenhum efeito na forma oocinética do parasita diretamente, sugerindo uma interação com a superfície do intestino do vetor.

Esses estudos apresentando resultados relacionados a peçonhas de serpentes e suas toxinas isoladas, especialmente as PLA₂s, e sua atividade anti-parasitária sugerem uma potencial aplicação biotecnológica destas toxinas no desenvolvimento de novas drogas inspiradas na biodiversidade e o uso destas na elucidação de mecanismos de morte celular e ciclo de vida destes parasitos.

6 CONCLUSÃO

O isolamento da PLA₂ homóloga Bmaj-II foi alcançado com uso de cromatografia de troca catiônica seguida por fase reversa. A proteína Bmaj-II mostrou uma massa molecular de 13.956 Da, e pI de 9,68. A Bmaj-II demonstrou alta tendência de apresentar formas multiméricas, evidenciado por eletroforese mono- e bi-dimensional, espectrometria de massa, e espalhamento de luz dinâmico. A ausência de atividade enzimática, 80% da sequência primária obtida, e a composição de estruturas secundárias permitem classificar a Bmaj-II como uma PLA₂ homóloga Lys49 inédita com um alto grau de similaridade com outras PLA₂s básicas Lys49 de peçonhas botrópicas. A peçonha de *B. marajoensis* e a Bmaj-II apresentaram atividade antiparasitária contra formas promastigotas de *Leishmania infantum*, epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e intraeritrocíticas de *Plasmodium falciparum*. No entanto, evidencia que a Bmaj-II contribui em associação com outras toxinas para atividade anti-parasitária da peçonha. Ensaio de citotoxicidade contra HepG2 revelaram índices de seletividade de 312 e 8,28 para a peçonha e a Bmaj-II, respectivamente. Este resultado encoraja mais estudos da peçonha de *B. marajoensis* para a identificação de novas toxinas anti-parasitárias.

7 REFERÊNCIAS

- ABADIR A.; PATEL A.; HAIDER S. Systemic therapy of New World cutaneous leishmaniasis: A case report and review article. **The Canadian Journal of Infectious Disease & Medical Microbiology**, v. 21 n. 2, p. 79-83, 2010.
- ADADE, C. M.; CARVALHO, A. L. O.; TOMAZ, M. A.; COSTA, T. F. R.; GODINHO, J. L.; MELO, P. A.; LIMA, A. P. C. A.; RODRIGUES, J. C. F.; ZINGALI, R. B.; SOUTO-PADRÓN, T. Crovirin, a Snake Venom Cysteine-Rich Secretory Protein (CRISP) with Promising Activity against Trypanosomes and Leishmania. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.
- ADADE, C. M.; CONS, B. L.; MELO, P. A.; SOUTO-PADRÓN, T. Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 138, p. 46–58, 2011.
- ALOULO, A.; ALI, Y. B.; BEZZINE, S.; GARGOURI, Y.; GELB, M. H. Phospholipases: An Overview. **Methods in Molecular Biology**, v. 861, p. 63-85, 2012.
- AMBROSIO, A. L. B.; NONATO, M. C.; DE ARAÚJO, H. S. S.; ARNI, R.; WARD, R. J.; OWNBY, C. L.; DE SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C. A Molecular Mechanism for Lys49-Phospholipase A₂ Activity Based on Ligand-induced Conformational Change. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 7326-7335, 2005.
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. 1-10, 2014.
- ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 6-12, 2003.
- BASTOS, C. J. C.; ARAS, R.; MOTA, G.; REIS, F.; DIAS, J. P.; DE JESUS, R. S.; FREIRE, M. S.; DE ARAÚJO, E. G.; PRAZERES, J.; GRASSI, M. F. R. Clinical Outcomes of Thirteen Patients with Acute Chagas Disease Acquired through Oral Transmission from Two Urban Outbreaks in Northeastern Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. 1-6, 2010.
- BERNARDE, P. S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 81 n. 1, p. 55-63, 2011.
- BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 499-503, 2003.
- BHATTACHARYA, S.; GHOSH, P.; DE, T.; GOMES, A.; GOMES, A.; DUNGDUNG, S. R. *In vivo* and *in vitro* antileishmanial activity of *Bungarus caeruleus* snake venom through alteration of immunomodulatory activity. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 126-133, 2013.

- BOCHNER, R.; FISZON, J. T.; MACHADO C. A Profile of Snake Bites in Brazil, 2001 to 2012. **Clinical Toxicology**, v. 4, n. 3, p. 1-7, 2014.
- BOUTRIN, M. C.; FOSTER, H. A.; PENTREATH, V. W. The effects of bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A₂ on *Trypanosoma brucei brucei* and enterobacteria. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 2, p. 246-251, 2008.
- BRASIL. Guia de Vigilância Epidemiológica – Caderno 14 – Acidentes por Animais Peçonhentos. *Ministério da Saúde*, 2008. Disponível em <http://www.saude.rs.gov.br/upload/1402342405_Guia%20de%20vigil%C3%A2ncia%20epidemiologica_7ed_anipe%C3%A7.pdf>. Acessado em Agosto de 2015.
- BRASIL. Doença de Chagas. *Ministério da Saúde*, 2014. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/doenca-de-chagas>>. Acessado em Julho de 2015.
- CALDERON, L. A.; SOBRINHO, J. C.; ZAQUEO, K. D.; DE MOURA, A. A.; GRABNER, A. N.; MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; NOMIZO, A.; FERNANDES, C. F. C.; ZULIANI, J. P.; CARVALHO, B. M. A.; DA SILVA, S. L.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 1-15, 2014.
- CALON, F.; LIM, G. P.; YANG, F.; MORIHARA, T.; TETER, B.; UBEDA, O.; ROSTAING, P.; TRILLER, A.; SALEM, N.; ASHE, K. H.; FRAUTSCHY, S. A.; COLE, G. M. Docosahexaenoic Acid Protects from Dendritic Pathology in an Alzheimer's Disease Mouse Model. **Neuron**, v. 43, n. 5, p. 633-645, 2004.
- CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 11, p. 1405-1414, 2007.
- CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v. 583, n. 11, p. 1736-1743, 2009.
- CAMPOS, S.; FARIA-CAMPOS, A.; TAVARES, R.; RAUSCH, H. F.; FERREIRA, E. A. L.; DE FREITAS, M. A. *Brazilian Venomous Snakes Database*. 2014. Disponível em <www.luar.dcc.ufmg.br/bravesdb>. Acessado em Julho de 2015.
- CARREGARI, V. C.; FLORIANO, R. S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Biochemical, pharmacological, and structural characterization of new basic PLA₂ bbil-tx from *Bothriopsis bilineata* snake venom. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 612649, p. 1-12, 2013.
- CASTILLO, J. C. Q.; VARGAS, L. J.; SEGURA, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; PÉREZ, J. C. A. *In Vitro* Antiplasmodial Activity of Phospholipases A₂ and a Phospholipase Homologue Isolated from the Venom of the Snake *Bothrops asper*. **Toxins**, v. 4, p. 1500-1516, 2012.

CASTILLO-VIGIL, A. Susceptibilidad de *Trypanosoma cruzi* a diferentes venenos de serpientes de Costa Rica. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v. XLVIII, p. 135–144, 2008.

CAVALCANTE, W. L. G.; HERNANDEZ-OLIVEIRA, S.; GALBIATTI, C.; RANDAZZO-MOURA, P.; ROCHA, T.; PONCE-SOTO, L.; MARANGONI, S.; PAI-SILVA, M. D.; GALLACCI, M.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Biological characterization of *Bothrops marajoensis* snake venom. **Journal of Venom Research**, v. 2, p. 37–41, 2011.

CDC-DPDx – Biology of Malaria. Center for Disease Control, 2015. Disponível em <<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>>. Acessado em Janeiro de 2016.

CDC. DPDx – Leishmaniasis General Information. Center for Disease Control, 2013a. Disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/gen_info/index.html>. Acessado em Setembro de 2015.

CDC. DPDx – Treatment of Malaria (Guidelines for Clinicians), 2013b. Disponível em <<http://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/clinicalguidance.pdf>>. Acessado em Março de 2016.

CDC. DPDx – Trypanosomiasis American Fact Sheet. Center for Disease Control, 2010. Disponível em <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/resources/factsheet.pdf>>. Acessado em Julho de 2015.

CHATELAIN, E. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 22–35, 2015.

CHAVES, F.; LEON, G.; ALVARADO, V. H.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1861–1869, 1998.

COGO, J. C.; LILLA, S.; SOUZA, G. H. M. F.; HYSLOP, S.; NUCCI, G. D. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochimie**, v. 88, p. 1947–1959, 2006.

CORRÊA, D.H.A.; RAMOS, C.H.I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **American Journal of Biomedical Research**, v. 3, p. 164–173, 2009.

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

COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; PRINHOLATO DA SILVA, C.; SORRECHIA, R.; DE ALBUQUERQUE, S.; PIETRO, R. C.; GHISLA, S.; ANTUNES, L. M.; SAMPAIO, S. V. Evaluating the microbicidal, antiparasitic and antitumor effects of CR-LAAO from *Calloselasma*

rhodostoma venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 489-497, 2015.

COSTA TORRES, A. F.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; DIZ FILHO, E.; ZARA, F. J.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M. G.; PINTO NOGUEIRA, N. A.; ROSA DE OLIVEIRA, M.; DE OLIVEIRA TOYAMA, D.; MONTEIRO, H. S.; MARTINS, A. M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 795-804, 2010.

CUI, L.; MHARAKURWA, S.; NDIAYE, D.; RATHOD, P. K.; ROSENTHAL, P. J. Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 57-68, 2015.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S.; SABO, E. F.; ONDETTI, M. A. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. **Biochemistry**, v. 16, p. 5484-5491, 1977.

DANTAS, R. T.; JORGE, A. R.; JORGE, R. J.; MENEZES, R. R.; LIMA, D. B.; TORRES, A. F.; TOYAMA, M. H.; MONTEIRO, H. S.; MARTINS, A. M. L-amino acid oxidase from *Bothrops marajoensis* causes nephrotoxicity in isolated perfused kidney and cytotoxicity in MDCK renal cells. **Toxicon**, v. 104, p. 52-56, 2015.

DAVIGNON, J. L.; HAYDER, M.; BARON, M.; BOYER, J. F.; CONSTANTIN, A.; APPARAILLY, F.; POUPOT, R.; CANTAGREL, A. Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 52, p. 590-598, 2013.

DE MENEZES, R. R.; TORRES, A. F.; DA SILVA, T. S.; DE SOUSA, D. F.; LIMA, D. B.; NOGUEIRA, N. A.; OLIVEIRA, M. F.; DE OLIVEIRA, M. R.; MONTEIRO, H. S.; MARTINS, A. M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothropoides lutzi* venom. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 1, p. 71-74, 2012.

DEL PRADO, G. R. L.; GARCÍA, C. H.; CEA, L. M.; ESPINILLA, V. F.; MORENO, M. F. M.; MÁRQUEZ, A. D.; POLO, M. J. P.; GARCÍA, I. A. Malaria in developing countries. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 1, p. 1-4, 2014.

DENNIS, E. A.; BURKE, J. E. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, v. 50, S237-42, 2009.

DENNIS, E. A.; DARKE, P. L.; DEEMS, R. A.; KENSIL, C. R.; PLUCKTHUN, A. Cobra venom phospholipase A₂: a review of its action toward lipid/water interfaces. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 36, n. 1, 37-45, 1981.

DEOLINDO, P.; TEIXEIRA-FERREIRA, A. S.; MELO, E. J.; ARNHOLDT, A. C.; SOUZA, W. D.; ALVES, E. W.; DAMATTA, R. A. Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 33-38, 2005.

DIZ FILHO, E. B. S.; MARANGONI, S.; TOYAMA, D. O.; FAGUNDES, F. H. R.; OLIVEIRA, S. C. B.; FONSECA, F. V.; CALGAROTTO, A. K.; JOAZEIRO, P. P.; TOYAMA, M. H. Enzymatic and structural characterization of new PLA₂ isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**, v. 53, n. 1, p. 104-114, 2009.

DOS SANTOS, J. I.; FERNANDES, C. A.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. The intriguing phospholipase A₂ homologues: relevant structural features on myotoxicity and catalytic inactivity. **Protein and Peptide Letters**, v. 16, n. 8, p. 887-893, 2009.

EDMAN, P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 4, p. 283-293, 1950.

EVANGELISTA, I. L.; MARTINS, A. M. C.; NASCIMENTO N. R. F.; HAVT, A.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; NORÕES, T. B. S.; TOYAMA, M. H.; DIZ-FILHO, E. B.; TOYAMA, D. O.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A₂. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1061-1070, 2010.

FAROOQUI, A. A.; ONG, W. Y.; HORROCKS, L. A. Inhibitors of Brain Phospholipase A₂ Activity: Their Neuropharmacological Effects and Therapeutic Importance for the Treatment of Neurologic Disorders. **Pharmacological Reviews**, v. 58, p. 591-620, 2006.

FAURE, G.; SAUL, F. Structural and Functional Characterization of Anticoagulant, FXa-binding Viperidae Snake Venom Phospholipases A₂. **Acta Chimica Slovenica**, v. 58, 671-677, 2011.

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. **Journal of Molecular Biology**, v. 412, p. 176-191, 2011.

FELICORI, L. F.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; SÁNCHEZ, E. F. Specific identification of *Lachesis muta muta* snake venom using antibodies against the plasminogen activator enzyme, LV-PA. **Toxicon**, v. 45, n. 6, p. 803-806, 2005.

FERNANDEZ-GOMES R.; HALIM Z.; SEBTI F.; LOYENS M.; BENSLIMANE A.; OUAISSI M. A. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interact with the parasites. **Toxicon**, v. 32, p. 875-882, 1994.

FERRÉ-D'AMARÉ, A. R.; BURLEY, S. K. Dynamic light scattering in evaluating crystallizability of macromolecules. **Methods in Enzymology**, v. 276, p.157-166, 1997.

FIOCRUZ. Agência Fiocruz de Notícias – Malária. Fundação Oswaldo Cruz, 2013. Disponível em <<http://agencia.fiocruz.br/mal%C3%A1ria>>. Acessado em Janeiro de 2016.

FLORIANO, R. S.; CARREGARI, V. C.; ABREU, V. A.; KENZO-KAGAWA, B.; PONCE-SOTO, L. A.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Pharmacological study of a new Asp49 phospholipase A₂ (Bbil-TX) isolated from

Bothriopsis bilineata smargadina (forest viper) venom in vertebrate neuromuscular preparations. **Toxicon**, v. 69, p. 191–199, 2013.

FRANÇA, S. C.; KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M.; TICLI, F. K.; PEREIRA, J. O.; ASTOLFI-FILHO, S.; STÁBELI, R. G.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, n. 2, p. 302-306, 2007.

FREMONT, D. H.; ANDERSON, D. H.; WILSON, I. A.; DENNIS, E. A.; XUONG, N. Crystal structure of phospholipase A₂ from Indian cobra reveals a trimeric association. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 342-346, 1993.

GALBIATTI C.; ROCHA T.; RANDAZZO-MOURA P.; PONCE-SOTO L. A.; MARANGONI S.; CRUZ-HÖFLING M. A.; RODRIGUES-SIMIONI L. Pharmacological and partial biochemical characterization of Bmaj-9 isolated from *Bothrops marajoensis* snake venom. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, n. 1, p. 62-72, 2012.

GOMES, A. C. A.; DE OLIVEIRA E SILVA, E. D.; NETO, I. C. P.; BEZERRA, T. P. Leishmaniose muco-cutânea: relato de caso clínico. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Bucodental**, v. 4, n. 4, p. 223-228, 2004.

GONÇALVES, A. R.; SOARES M. J.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W. Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Parasitology Research**, v. 88, p. 598-602, 2002.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. L. R. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GU, L.; WANG, Z.; SONG, S.; SHU, Y.; LIN, Z. Crystal structures of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Naja kaouthia*. **Toxicon**, v. 40, n. 7, p. 917-922, 2002.

GUILLAUME, C.; DEREGNAUCOURT, C.; CLAVEY, V.; SCHRÉVEL, J. Anti-*Plasmodium* properties of group IA, IB, IIA and III secreted phospholipases A₂ are serum-dependent. **Toxicon**, v. 43, n. 3, p. 311-318, 2004.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; ALAPE-GIRÓN, A.; FLORES-DIAZ, M.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; CALVETE, J. J. Snake venomomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 165-182, 2009.

HARVEY, A. L. Toxins and drug discovery. **Toxicon**, v. 92, p. 193-200, 2014.

HELENO, M. A. G.; BALDASSO, P. A.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S. Biochemical characterization and pharmacological properties of new basic PLA₂ brtx-i isolated from *Bothrops roedingeri* (Roedinger's Lancehead) Mertens, 1942, Snake Venom. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 591470, p. 1-13, 2013.

HOFMANN, A. Spectroscopic techniques: I Spectrophotometric techniques. In: WILSON, K.; WALKER J. (Ed.), **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**, Cambridge University Press, Cambridge, 2010.

JABEEN, T.; SINGH, N.; SINGH, R. K.; ETHAYATHULLA, A. S.; SHARMA, S.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T. P. Crystal structure of a novel phospholipase A₂ from *Naja naja sagittifera* with a strong anticoagulant activity. **Toxicon**, v. 46, n. 8, p. 865-875, 2005.

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

KARAGIANNIS-VOULES, D. A.; SCHOLTE, R. G. C.; GUIMARÃES, L. H.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P. Bayesian Geostatistical Modeling of Leishmaniasis Incidence in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1-13, 2013.

KASTNER, M. Protein Liquid Chromatography. **Journal of Chromatography**, v.61, p. 1-933, 1999.

KELLY, J. M. **Molecular Mechanisms of Pathogenesis in Chagas Disease**. *Medical Intelligence Unit*, 2003.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1751, p. 119-139, 2005.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579-593, 2015.

KHOW, O.; CHANHOME, L.; OMORI-SATOH, T.; OGAWA, Y.; YANOSHITA, R.; SAMEJIMA, Y.; KUCH, U.; MEBS, D.; SITPRIJA, V. Isolation, toxicity and amino terminal sequences of three major neurotoxins in the venom of Malayan krait (*Bungarus candidus*) from Thailand. **The Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 6, p. 799-804, 2003.

KIERSZENBAUM, F. Chagas' Disease and the Autoimmunity Hypothesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 210-223, 1999.

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1147-1161, 2005.

- KOHLHOFF, M.; BORGES, M. H.; YARLEQUE, A.; CABEZAS, C.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 7, p. 2181–2195, 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LIU, C. S.; CHEN, J. M.; CHANG, C. H.; CHEN, S. W.; TENG, C. M.; TSAI, I. H. The amino acid sequence and properties of an edema-inducing Lys-49 phospholipase A₂ homolog from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1077, n. 3, p. 362-370, 1991.
- LOK, S.; GAO, R.; ROUAULT, M.; LAMBEAU, G.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; SWAMINATHAN, K. Structure and function comparison of *Micropechis ikaheka* snake venom phospholipase A₂ isoenzymes. **FEBS Journal**, v. 272, p. 1211-1220, 2005.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; MORENO, E. Synthetic peptides derived from the C-terminal region of Lys49 phospholipase A₂ homologues from viperidae snake venoms: biomimetic activities and potential applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 28, p. 3224-3230, 2010.
- LONGLEY, R. J.; HILL, A. V. S.; SPENCER, A. J. Malaria vaccines: identifying *Plasmodium falciparum* liver-stage targets. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 965, p. 1-8, 2015.
- MACKESSY, S. P. Classification of PLA₂ Enzymes. In: **Mackessy, S. P., ed. Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. Boca Raton: CRC Press, p. 176-178, 2010.
- MARQUES-PORTO, R.; LEBRUN, I.; PIMENTA, D. C. Self-proteolysis regulation in the *Bothrops jararaca* venom: The metallopeptidases and their intrinsic peptidic inhibitor. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 147, n. 4, p. 424–433, 2008.
- MARUÑAK, S. L.; LEIVA L.; GARCIA DENEGRI, M. E.; TEIBLER, P.; ACOSTA DE PÉREZ, O. Isolation and biological characterization of a basic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biocell**, v. 31, n. 3, p. 355-364, 2007.
- MAUEL, J. Mechanisms of survival of protozoan parasites in mononuclear phagocytes. **Parasitology**, v. 88, p. 579-592, 1984.
- MILLER, L. H.; DVORAK, J. A.; SHIROISHI, T.; DUROCHER, J. R. Influence of erythrocyte membrane components on malaria merozoite invasion. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 138, n. 6, p. 1597-1601, 1973.
- MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic Options for Visceral Leishmaniasis, **Drugs**, v. 73, n. 17, p. 1863-1888, 2013.

MORA-OBANDO, D.; FERNÁNDEZ, J.; MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Synergism between Basic Asp49 and Lys49 Phospholipase A₂ Myotoxins of Viperid Snake Venom *In Vitro* and *In Vivo*. **PLoS One**, v. 9, n. 10, e109846, 2014.

MOURA, A.A.; KAYANO, A.M.; OLIVEIRA, G.A.; SETUBAL, S.S.; RIBEIRO, J.G.; BARROS, N. B.; NICOLETE, R.; ANDRADE, L. M.; FULY, A. L.; NOMIZO, A.; da SILVA, S.L.; FERNANDES, C. F. C.; ZULIANI, J.P.; STÁBELI, R.G.; SOARES, A.M.; CALDERON, L.A. Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops matto grossensis* snake venom with toxicity against *Leishmania* and tumor cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

NAKANISHI, K.; BEROVA, N.; WOODY, R. **Circular dichroism: principles and applications**. VCH, p. 1-570, 1994.

NUNES, D. C.; FIGUEIRA, M. M.; LOPES, D. S.; DE SOUZA, D. L.; IZIDORO, L. F.; FERRO, E. A.; SOUZA, M. A.; RODRIGUES, R. S.; RODRIGUES, V. M.; YONEYAMA, K. A. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology**, v. 140, n. 7, p. 844-854, 2013.

PAN, Y. H.; BAHNSON, B. J. Structure of a premicellar complex of alkyl sulfates with the interfacial binding surfaces of four subunits of phospholipase A₂. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1804, n. 7, p. 1443-1448, 2010.

PASSERO, L. F.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M. D.; TOYAMA, M. H. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus ssp.* venoms. **Parasitology Research**, v. 101, n. 5, p. 1365-1371, 2007.

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G. W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 2, p. 120-127, 2002.

PEREZ, C. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. Chagas disease: the challenge of polyparasitism? **Trends in parasitology**, v. 30, n. 4, p. 176-182, 2014.

PONCE-SOTO, L. A.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI S. Neurotoxic, Myotoxic and Cytolytic Activities of the New Basic PLA₂ Isoforms BmjeTX-I and BmjeTX-II Isolated from the *Bothrops marajoensis* (Marajó Lancehead) Snake Venom. **The Protein Journal**, v. 29, n. 2, p. 103-113, 2010.

PORTO, B. N.; TELLI, C. A.; DUTRA, T. P.; ALVES, L. S.; BOZZA, M. T.; FIN, C. A.; THIESEN, F. V.; RENNER, M. F. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 270-277, 2007.

QUIÑONES, M. L.; NORRIS, D. E.; CONN, J. E.; MORENO, M.; BURKOT, T. R.; BUGORO, H.; KEVEN, J. B.; COOPER, R.; YAN, G.; ROSAS, A.; PALOMINO, M.; DONNELLY, M. J.;

MAWEJJE, H. D.; EAPEN, A.; MONTGOMERY, J.; COULIBALY, M. B.; BEIER, J. C.; KUMAR, A. Insecticide Resistance in Areas under Investigation by the International Centers of Excellence for Malaria Research: A Challenge for Malaria Control and Elimination. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 69-78, 2015.

QUINTANA, J. C.; CHACÓNA, A. M.; VARGAS, L.; SEGURA, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; ALARCÓN, J. C. Antiplasmodial effect of the venom of *Crotalus durissus cumanensis*, crotoxin complex and Crotoxin B. **Acta Tropica**, v. 124, p. 126-132, 2012.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; DE JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 147-154, 2014.

REITHINGER R.; DUJARDIN J. C.; LOUZIR H.; PRIMEZ C.; ALEXANDER B.; BROOKER S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

RICHMOND, G. S.; SMITH, T. K. Phospholipases A₁. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 588-612, 2011.

RODRIGUES, J. C.; GODINHO, J. L.; DE SOUZA, W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. **Sub-cellular Biochemistry**, v. 74, p. 1-42, 2014.

RODRÍGUEZ-MORALES, O.; MONTEÓN-PADILLA, V.; CARRILLO-SÁNCHEZ, S. C.; RIOS-CASTRO, M.; MARTÍNEZ-CRUZ, M.; CARABARIN-LIMA, A.; ACRE-FONSECA, M. Experimental Vaccines against Chagas Disease: A Journey through History. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

SÁ, J. M.; CHIOATO, L.; FERREIRA, T. L.; DE OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. Topology of the substrate-binding site of a Lys49-phospholipase A₂ influences Ca²⁺-independent membrane-damaging activity. **Biochemical Journal**, v. 382, p. 191-198, 2004.

SALVADOR, G. H. M.; FERNANDES, C. A. H.; MAGRO, A. J.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; CAVALCANTE, W. L. G.; FERNANDEZ, R. M.; GALLACCI, M.; SOARES, A. M.; OLIVEIRA, C. L. P.; FONTES, M. R. M. Structural and Phylogenetic Studies with MjTX-I Reveal a Multi-Oligomeric Toxin – a Novel Feature in Lys49-PLA₂s Protein Class. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. 1-11, 2013.

SANTOS, M. F. L.; FARANI, M. C.; ROCHA, P. N. Acute kidney injury in *Bothrops sp.* and *Crotalus sp.* envenomation: critical review of the literature. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 31, n. 2, p. 132-138, 2009.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 6, p. 588-596, 2015.

SEGELKE, B. W.; NGUYEN, D.; CHEE, R.; XUONG, N. H.; DENNIS, E. A. Structures of two novel crystal forms of *Naja naja naja* phospholipase A₂ lacking Ca²⁺ reveal trimeric packing. **Journal of Molecular Biology**, v. 279, n. 1, p. 223-232, 1998.

SHUKLA, P. K.; HARIDAS, M.; CHANDRA, D. N.; SINHA, M.; KAUR, P.; SHARMA, S.; SINGH, T. P. Crystal Structure of the complex of group II phospholipase A₂ with a 3-{3-[(Dimethylamino)methyl]-1H-indol-7-yl}propan-1-ol at 2.21 Å Resolution. **Protein Data Bank**, 2012. Disponível em <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4HMB>>. Acessado em Janeiro de 2016.

SICILIANO, G.; ALANO, P. Enlightening the malaria parasite life cycle: bioluminescent *Plasmodium* in fundamental and applied research. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 391, p. 1-8, 2015.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SINGH, B.; KIM SUNG, L.; MATUSOP, A.; RADHAKRISHNAN, A.; SHAMSUL, S. S.; COX-SINGH, J.; THOMAS, A.; CONWAY, D. J. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **Lancet**, v. 363, n. 9414, p. 1017-1024, 2004.

SINGH, G.; GOURINATH, S.; SARAVANAN, K.; SHARMA, S.; BHANUMATHI, S.; BETZEL, C.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T. P. Sequence-induced trimerization of phospholipase A₂: structure of a trimeric isoform of PLA₂ from common krait (*Bungarus caeruleus*) at 2.5 Å resolution. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 61, p. 8-13, 2005.

SOARES, A. M. **Estrutura, função e inibição de miotoxinas homólogas a fosfolipases A₂ isoladas de venenos de serpentes**, 2000. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Faculdade de Medicina de Riberão Preto, Universidade de São Paulo, Riberão Preto. Tese (Doutorado).

SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, n. 1, p. 7-15, 2000.

SPENCER, P. J.; AIRD, S. D.; BONI-MITAKE, M.; NASCIMENTO, N.; ROGERO, J. R. A single-step purification of bothropstoxin-1. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 9, p. 1125-1127, 1998.

STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M.; SOARES, A. M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: An

example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 142, p. 371-381, 2006.

STÁBELI, R. G.; SIMÕES-SILVA, R.; KAYANO, A. M.; GIMENEZ, G. S.; MOURA, A. A.; CALDEIRA, C. A. S.; COUTINHO-NETO, A.; ZAQUEO, K. D.; ZULIANE, P. J.; CALDERON, L. A.; SOARES, A. M. Purification of Phospholipases A₂ from American Snake Venoms, **Chromatography-The Most Versatile Method of Chemical Analysis**. Croácia: InTech, p. 1-34, 2012.

TEIXEIRA, A. R.; TEIXEIRA, G.; MACÊDO, V.; PRATA, A. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 62, n. 6, p. 1132-1141, 1978.

TELES, C. B. G.; MOREIRA, L. S.; SILVA, A. A. E.; FACUNDO, V. A.; ZULIANI, J. P.; STÁBELI, R. G.; SILVA-JARDIM, I. Activity of the Lupane Isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* Promastigotes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 936-942, 2011.

TEMPONE A. G.; ANDRADE H. F. Jr; SPENCER P. J.; LOURENÇO, C. O.; ROGERO J. R.; NASCIMENTO N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania spp.* with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, p. 620-624, 2001.

TERRA, A. L.; MOREIRA-DILL, L. S.; SIMÕES-SILVA, R.; MONTEIRO, J. R.; CAVALCANTE, W. L.; GALLACCI, M.; BARROS, N. B.; NICOLETE, R.; TELES, C. B.; MEDEIROS, P. S.; ZANCHI, F. B.; ZULIANI, J. P.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Biological characterization of the Amazon coral *Micrurus spixii* snake venom: Isolation of a new neurotoxic phospholipase A₂. **Toxicon**, v. 103, p. 1-11, 2015.

TIMM, B. L.; DA SILVA, P. B.; BATISTA, M. M.; FARAHAT A. A.; KUMAR, A.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. C. *In vitro* investigation of the efficacy of novel diamidines against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 141, n. 10, p. 1272-1276, 2014.

TORRES, A. F. C. **Ação Antibacteriana, Antifúngica e Antiparasitária dos Venenos das Serpentes *Bothrops leucurus* e *Bothrops marajoensis* e de suas frações Fosfolipase A₂ e L-Aminoácido Oxidase**, 2009. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. Dissertação (Mestrado).

TORRES-HUACO, F. D.; PONCE-SOTO, L. A.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S. Purification and characterization of a new weak hemorrhagic metalloproteinase BmHF-1 from *Bothrops marajoensis* snake venom. **The Protein Journal**, v. 29, n. 6, p. 407-416, 2010.

TSAI, I. H.; LU, P. J.; WANG, Y. M.; HO, C. L.; LIAW, L. L. Molecular cloning and characterization of a neurotoxic phospholipase A₂ from the venom of Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*). **Biochemical Journal**, v. 311, p. 895-900, 1995.

VILCA-QUISPE, A.; PONCE-SOTO, L. A.; WINCK, F. V.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 745-753, 2010.

WALTER, M.; NYMAN, D.; KRAJNC, V.; DUCKERT, F. The activation of plasma factor XII with the snake venom enzymes ancrod and batroxobin marajoensis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 38, n. 2, p. 438-446, 1977.

WARD, R. J.; CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; SA, J. M. Active-site mutagenesis of a Lys-49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochemical Journal**, v. 362, p. 89-96, 2002.

WEINRAUCH, Y.; ABAD, C.; LIANG, N. S.; LOWRY, S. F.; WEISS, J. Mobilization of potent plasma bactericidal activity during systemic bacterial challenge. Role of group IIA phospholipase A₂. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 3, p. 633-638, 1998.

WESOLOWSKI, R.; WOZNIAK, A.; MILA-KIERZENKOWSKA, C.; SZEWCZYK-GOLEC, K. *Plasmodium knowlesi* as a Threat to Global Public Health. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 53, n. 5, p. 575-581, 2015.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis), Fact Sheet n. 340. World Health Organization, 2014a. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acessado em Julho de 2015.

WHO. Guidelines for the Treatment of Malaria. 3rd edition. Geneva: World Health Organization, 2015a.

WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. World Health Organization, 2015b. Disponível em <http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564861/en/>. Acessado em Outubro de 2015.

WHO. Leishmaniasis, Essential leishmaniasis maps. World Health Organization, 2010. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/>. Acessado em Setembro de 2015.

WHO. Leishmaniasis, Fact Sheet n. 375. World Health Organization, 2014b. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acessado em Julho de 2015.

WHO. Neglected Tropical Diseases: Snakebite. World Health Organization, 2014c. Disponível em <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/>. Acessado em Julho de 2015.

WHO. Snake antivenoms, Fact Sheet n. 337. World Health Organization, 2015c. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/en/>>. Acessado em Janeiro de 2016.

WHO. World Malaria Report. World Health Organization, 2015d. Disponível em <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf?ua=1>. Acessado em Janeiro de 2016.

WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J. M.; HARRISON, R. Global snake bite initiative working group; international society on toxinology. The global snake bite initiative: an antidote for snake bite. **Lancet**, v. 375, p. 89–91, 2010.

WINGET, J. M.; PAN, Y. H.; BAHNSON, B. J. The interfacial binding surface of phospholipase A₂s. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1260-1269, 2006.

XIMENES, R. M.; ALVES, R. S.; PEREIRA, T. P.; ARAÚJO, R. M.; SILVEIRA, E. R.; RABELLO, M. M.; HERNANDES, M. Z.; SOARES, V. C. G.; BRISTOT, D.; PIRES, C. L.; TOYAMA, D. O.; GAETA, H. H.; MONTEIRO, H. S. A.; TOYAMA, M. H. Hapalycin 2 inhibits the enzymatic and platelet aggregation activities of PrTX-III, a D49 phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* venom. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v. 12, n. 139, p. 1-10.

ZIELER, H.; KEISTER, D. B.; DVORAK, J. A.; RIBEIRO, J. M. C. A snake venom phospholipase A₂ blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 4157-4167, 2001.

ZOUARI-KESSENTINI, R.; SRAIRI-ABID, N.; BAZAA, A.; AYEB, M. E.; LUIS, J.; MARRAKCHI, N. Antitumoral Potential of Tunisian Snake Venoms Secreted Phospholipases A₂. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

8 APÊNDICES

APÊNDICE A: Alinhamento múltiplo das PLA ₂ s BmjeTX-I e BmjeTX-II com outras PLA ₂ s Asp49 de peçonhas de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	89
APÊNDICE B: Alinhamento múltiplo da PLA ₂ BmarPLA ₂ com outras PLA ₂ s Lys49 de peçonhas de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	90
APÊNDICE C: Alinhamento múltiplo da PLA ₂ Bmaj-9 com outras PLA ₂ s Asp49 de peçonhas de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	91

APÊNDICE A: Alinhamento múltiplo das PLA₂s BmjeTX-I e BmjeTX-II com outras PLA₂s Asp49 de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*

BmjeTX-I	DLWQFGQMI LKETGKI PFPYYGAYGCYCGWGGRRGGKPKAG--TDRCCYVHDCCYGKLTSC	58
BmjeTX-II	DLWQWGQMI LKETGKI PFSYYGAYGCYCGWGGRRGGKPKAG--TDRCCYVHDCCYGKLTSC	58
BlatPLA ₂	-LLQFREMI TKMTGKEPI FFYAFYGCYCGLGGRG-KQDA--TDRCCFVHDCCYGKVTGC	56
BthTX-II	DLWQFGQMI LKETGKLPFPYYTTYGCYCGWGGQG-QPKDA--TDRCCFVHDCCYGKLTNC	57
BtxTX-II	DLWQFGQMI LKETGKLPFPYYTTYGCYCGWGGQG-QPKDA--TDRCCFVHDCCYGKLTNC	57
Myotoxin-III	SLI EFAKMI LEETKRLPFPYYTTYGCYCGWGGQG-QPKDA--TDRCCFVHDCCYGKLSNC	57
BmTX-I	DLWQFNKMI KKEVGKLPFPYFAYGCYCGWGGRRGKPKDG--TDRCCFVHDCCYKLTGC	58
PrTX-III	DLWQFGQMI LKETGKLPFPYYTYGGCYCGVGGRRG---LGTKDDRCCYVHDCCYKLTGC	57
	* : : ** : . : * : * ***** ** : . ***** ***** * : *	
BmjeTX-I	PKTDDRYSYSWLDGTI VCGEDDPCK-ELCECDKKI AVCFRENLTYNKKYRYHL-KSCCK	116
BmjeTX-II	PKTDDRYSYSRLDLTI VCGEDDPCK-ELCECDKKI AVCFRENLTYNKKYRYHL-KSCCK	116
BlatPLA ₂	DPKKDI YTYSEENGAFVCGGDDPCKKEI CECDKNAAI CFRNDLDYDYKYLLYSPENCQE	116
BthTX-II	KPKTDRYSYSRENGVI I CGEGTPCEKQI CECDKAAAVCFRENLRITYKKRYMAYPDVLCK	117
BtxTX-II	KPKTDRYSYSRENGVI I CGEGTPCEKQI CECDKAAAVCFRENLRITYKKRYMAYPDVLCK	117
Myotoxin-III	KPKTDRYSYSRKSGVI I CGEGTPCEKQI CECDKAAAVCFRENLRITYKKRYMAYPDLLCK	117
BmTX-I	PKWDDRYSYSWKDI TI VCGEDLPCE-EI CECDRAAAVCFYENLTYNKKYMKHL-KPCKK	116
PrTX-III	PKTDDRYSYSWLDLTI VCGEDDPCK-ELCECDKAI AVCFRENLTYNKKYRYHL-KPCKK	115
	* * : ** . . : : ** * : : : ***** : * : ** : : * * * : * : * : *	
BmjeTX-I	ADKPC	121
BmjeTX-II	ADKPC	121
BlatPLA ₂	ESEPC	121
BthTX-II	PAEKC	122
BtxTX-II	PAEKC	122
Myotoxin-III	PA---	119
BmTX-I	ADYPC	121
PrTX-III	ADKPC	120

*Representa os resíduos conservados entre todas as sequências. :Indica conservação entre grupos de propriedades fortemente similares = > 0.5 no *Gonnet PAM 250 matrix*. .Indica conservação entre grupos de propriedades fracamente similares = < 0.5 no *Gonnet PAM 250 matrix*.

APÊNDICE B: Alinhamento múltiplo da PLA₂ BmarPLA₂ com outras PLA₂s Lys49 de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*

BmarPLA ₂	SLLELGKMI LQETGKMPSKSYGAYGCNCGVLGR 33
MTX-II	SLVELGKMI LQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGR 33
Myotoxi n-I	SLVELGKMI LQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGR 33
BbTX-II	SLFELGKMI LQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGR 33
PrTX-II	SLFELGKMI LQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGR 33
Bnsp-7	SLFELGKMI LQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGR 33
PrTX-I	SLFELGKMI LQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGR 33
BthTX-I	SLFELGKMI LQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGR 33
	** . ***** * . *****

*Representa os resíduos conservados entre todas as sequências. .Indica conservação entre grupos de propriedades fortemente similares = > 0.5 no *Gonnet PAM 250 matrix*. Indica conservação entre grupos de propriedades fracamente similares = < 0.5 no *Gonnet PAM 250 matrix*.

APÊNDICE C: Alinhamento múltiplo da PLA₂ Bmaj-9 com outras PLA₂s Asp49 de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*

Bmaj -9	DLWQWGQMI LKETGKLPFSYYTAYGCYCGWGGRRGKPKA--DTDRCCFVHDC	50
BlatPLA2	-LLQFREMI TKMTGKEPI FFYAFYGCYCGLGGRG-KQDA--TDRCCFVHDC	48
PrTX-III	DLWQFGQMI LKETGKLPFPYYTYGGCYCGVGGRRG---LGTKDDRCCYVHDC	49
BmTX-I	DLWQFNKMI KKEVGKLPFPYGYAYGCYCGWGGRGEKPKDG--TDRCCFVHDC	50
Myotoxin-III	SLI EFAKMI LEETKRLPFPYYTTYGCYCGWGGQG-QPKDA--TDRCCFVHDC	49
BthTX-II	DLWQFGQMI LKETGKLPFPYYTTYGCYCGWGGQG-QPKDA--TDRCCFVHDC	49
BmjeTX-I	DLWQFGQMI LKETGKI PFPYYGAYGCYCGWGGRRGKPKAG--TDRCCYVHDC	50
BmjeTX-II	DLWQWGQMI LKETGKI PFSYYGAYGCYCGWGGRRGKPKAG--TDRCCYVHDC	50
	* : : ** : . : * : * ***** **: ***** **:	

*Representa os resíduos conservados entre todas as sequências. :Indica conservação entre grupos de propriedades fortemente similares = > 0.5 no *Gonnet PAM 250 matrix*. .Indica conservação entre grupos de propriedades fracamente similares = < 0.5 no *Gonnet PAM 250 matrix*.

9 ANEXOS

9.1 AUTORIZAÇÃO DE ACESSO DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

 <p style="text-align: center;">Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético</p> <p>O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.</p> <p style="text-align: center;">Brasília, 29 de Novembro de 2011</p> <p style="text-align: center;">Paulo Sergio Lacerda Beirao Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde PO 161/2010</p>	<p>Processo: 010627/2011-1 Validade: 15/11/2011 a 15/11/2017 Instituição: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ CNPJ: 337.810.550/0001-35 Pesquisador: Leonardo de Azevedo Calderon CPF: 026.810.686-06 RG: 1689177 - SSP / DF</p> <p><i>Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V. Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/ e informar o número do protocolo 2975416614551156 para recuperá-la do banco de dados do CNPq</i></p>
--	--