



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS PARA DOSAGEM DA ATIVIDADE
FOSFOLIPÁSICA EM VENENOS DE SERPENTES**

AMANDA SOUZA DE PAULA

Goiânia, 2022

Amanda Souza de Paula

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS PARA DOSAGEM DA ATIVIDADE
FOSFOLIPÁSICA EM VENENOS DE SERPENTES**

Monografia apresentada à Escola de Ciências Médicas e da Vida para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Matheus Godoy Pires

Coorientadora: Dra. Marta Regina Magalhães

Goiânia, 2022

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BANCA EXAMINADORA DA MONOGRAFIA

Aluna: Amanda Souza de Paula

Orientador: Dr. Matheus Godoy Pires

Coorientadora: Dra. Marta Regina Magalhães

Membros:

1. Dr. Matheus Godoy Pires

2. Dra. Sayonara Ay More de Oliveira

3. Dr. Nelson Jorge da Silva Jr.

Goiânia, 2022

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso criador, por me dar forças para persistir e realizar este trabalho com muita dedicação.

A PUC Goiás pela concessão de uma bolsa de graduação integral mediante o Prouni.

Ao Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas, especificamente o Laboratório de Toxinologia sob a coordenação da Dra. Marta Regina Magalhães.

Ao Dr. Matheus Godoy Pires e Dra. Marta Regina Magalhães, pela preciosa orientação, paciência e colaboração.

A todos os professores, que tanto contribuíram para nossa formação ao longo dessa jornada.

Aos colegas da turma, pelos quatro maravilhosos anos de grande aprendizagem, trabalho em equipe e momentos descontraídos.

Aos meus familiares, pelo apoio incessante.

A todos que, de forma direta ou indireta, cooperaram para a concretização desse trabalho.

RESUMO

O veneno das serpentes é uma mistura com grande diversidade molecular que possui implicações inter e intraespecíficas e, conseqüentemente, acarreta na variedade das atividades fisiopatológicas e complexidade na produção de soros antiofídicos. Dentre esta diversidade molecular, as fosfolipases são enzimas hidrolíticas majoritárias nos venenos ofídicos e causadoras de uma ampla gama de efeitos farmacológicos. O presente estudo busca padronizar ensaios para a dosagem de atividade fosfolipásica para um perfil “screening” voltado para o Laboratório de Toxinologia do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da PUC Goiás mediante os ensaios descritos por Marinetti (1965) e Gutiérrez, Ownby e Odell (1984), além de executar um ensaio complementar de hemólise indireta em placa. Ambos os ensaios foram padronizados para as condições do Laboratório de Toxinologia do CEPB e são caracterizados, comumente, por serem simples, rápido e barato. A padronização do substrato revelou as concentrações 2,5 mg/ml e 3,125 mg/ml como ideais para os ensaios de Marinetti (1965) e Gutiérrez, Ownby e Odell (1984), respectivamente. Adicionalmente, uma padronização de veneno foi realizada utilizando como parâmetro o veneno de *Bothrops moojeni*, sendo a concentração de até 0,5 mg/ml considerada adequada para ambos os ensaios. O ensaio complementar de hemólise indireta em placa também exibiu similaridades entre as concentrações de 0,5 e 1 mg/ml. As amostras de veneno de *Bothrops jararacussu*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus collilineatus* foram testadas pelos ensaios padronizados indicando uma atividade fosfolipásica (geral e PLA₂) alta e similar para *B. jararacussu* e *C.d. collilineatus*, moderada para *B. atrox* e baixa para *B. alternatus*. Não obstante os ensaios tratados se caracterizem como menos recomendados para a dosagem de atividade fosfolipásica, enfatizamos a importância desses ensaios espectrofotométricos simples para testes preliminares na pesquisa científica, ponderando a padronização de ensaios bioquímicos como fundamental na área de biologia experimental.

Palavras-chaves: Padronização; Ensaio; Fosfolipase; Veneno; Serpentes.

ABSTRACT

Snake venom is a mixture with great molecular diversity that has inter and intraspecific implications and, consequently, leads to a variety of pathophysiological activities and complexity in the production of antivenom. Among this molecular diversity, phospholipases are major hydrolytic enzymes in snake venoms and cause a wide range of pharmacological effects. The present study seeks to standardize assays for the measurement of phospholipase activity for a screening profile aimed at the Toxinology Laboratory of the Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas at PUC Goiás through the assays described by Marinetti (1965) and Gutiérrez, Ownby and Odell (1984), beyond to performing a complementary indirect hemolysis plate assay. Both assays were standardized for the conditions of the CEPB Toxinology Laboratory and are commonly characterized by being simple, fast and inexpensive. Substrate standardization revealed concentrations of 2,5 mg/ml and 3,125 mg/ml as ideal for the assays by Marinetti (1965) and Gutiérrez, Ownby and Odell (1984), respectively. Additionally, a venom standardization was performed using the *Bothrops moojeni* venom as a parameter, with a concentration of up to 0,5 mg/ml considered appropriate for both assays. The complementary indirect hemolysis plaque assay also exhibited similarities between concentrations of 0,5 and 1 mg/ml. *Bothrops jararacussu*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops atrox* and *Crotalus durissus collilineatus* venom samples were tested by standardized assays indicating a high and similar phospholipase activity (general and PLA₂) for *B. jararacussu* and *C.d. collilineatus*, moderate for *B. atrox* and low for *B. alternatus*. Notwithstanding that the treated assays are characterized as less recommended for the measurement of phospholipase activity, we emphasize the importance of these simple spectrophotometric assays for preliminary tests in scientific research, considering the standardization of biochemical assays as fundamental in the area of experimental biology.

Keywords: Standardization; Assay; Phospholipase; Venom; Snakes.

FIGURAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Notificações de acidentes ofídicos por serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> na região Centro-Oeste nos últimos três anos | 2 |
| Figura 2. Sítios de ação das fosfolipases | 4 |
| Figura 3. Evolução convergente das atividades tóxicas das fosfolipases A ₂ (PLA ₂) do veneno de serpentes em Elapidae e Viperidae | 6 |
| Figura 4. Curva padrão do substrato | 17 |
| Figura 5. Atividade enzimática pelo ensaio de Marinetti (1965) para a padronização do substrato | 18 |
| Figura 6. Atividade enzimática pelo ensaio de Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) para a padronização do substrato | 20 |
| Figura 7. Atividade enzimática pelo ensaio de Marinetti (1965) para padronização do veneno | 22 |
| Figura 8. Atividade enzimática pelo ensaio de Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) para a padronização do veneno | 23 |
| Figura 9. Atividade enzimática pelo ensaio de hemólise indireta em placa | 26 |
| Figura 10. Atividade enzimática pelo ensaio de Marinetti (1965) e Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) em amostras de veneno de diferentes espécies | 29 |

QUADROS E TABELAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1. Classes de fosfolipase A ₂ | 5 |
| Tabela 1. Atividade enzimática pelo ensaio de Marinetti (1965) para a padronização do substrato | 17 |
| Tabela 2. Atividade enzimática pelo ensaio de Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) para a padronização do substrato | 19 |
| Tabela 3. Atividade enzimática pelo ensaio de Marinetti (1965) para a padronização do veneno | 21 |
| Tabela 4. Atividade enzimática pelo ensaio de Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) para a padronização do veneno | 21 |
| Tabela 5. Atividade enzimática pelo ensaio de Marinetti (1965) em amostras de veneno de diferentes espécies | 27 |
| Tabela 6. Atividade enzimática pelo ensaio de Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) em amostras de veneno de diferentes espécies | 28 |

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Fosfolipases | 3 |
| 1.1.1. Ensaios de dosagem fosfolipásica | 7 |
| 2. OBJETIVOS | 11 |
| 2.1. Objetivo geral | 11 |
| 2.2. Objetivos específicos | 11 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 12 |
| 3.1. Amostra de veneno | 12 |
| 3.2. Dosagem de substrato | 12 |
| 3.3. Atividade fosfolipásica pelo ensaio turbidimétrico | 12 |
| 3.3.1. Teste de variação do substrato | 12 |
| 3.3.2. Teste de variação do veneno | 13 |
| 3.3.3. Teste de variação interespecífica | 13 |
| 3.4. Atividade fosfolipásica pelo ensaio de hemólise indireta em tubo | 13 |
| 3.4.1. Teste de variação do substrato | 13 |
| 3.4.2. Teste de variação do veneno | 14 |
| 3.4.3. Teste de variação interespecífica | 14 |
| 3.5. Atividade fosfolipásica pelo ensaio de hemólise indireta em placa | 15 |
| 3.6. Análise estatística | 15 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 16 |
| 5. CONCLUSÃO | 32 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 34 |

1. INTRODUÇÃO

As serpentes (Classe Reptilia: Ordem Squamata) constituem uma subordem de vertebrados que apresentam um corpo alongado escamoso, ausência de membros locomotores e um crânio especializado com articulações flexíveis, permitindo maior cinetismo e, conseqüentemente, alimentação de presas extensas (BERNARDE, 2014). Atualmente, estima-se o registro de 430 serpentes brasileiras e, ainda, contabilizando as subespécies, soma-se 457 (COSTA; GUEDES; BÉRNILS, 2021). Uma faceta dessa diversidade de serpentes é de caráter peçonhento, as quais possuem glândulas de veneno e aparelho inoculador com o propósito central e evolutivo de captura da presa e auxílio nas atividades digestivas, assim como a defesa na posição de função secundária. No Brasil, as serpentes peçonhentas estão agrupadas em duas famílias: Elapidae (majoritariamente o gênero *Micrurus*) e Viperidae (gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*) (BERNARDE, 2014; PEREIRA FILHO; VIEIRA; FRANÇA, 2020).

Uma parte dos representantes da família *Viperidae* possui uma distribuição geográfica predominantemente em áreas de cerrado, destacando os gêneros *Bothrops* e *Crotalus* (PEREIRA FILHO; VIEIRA; FRANÇA, 2020). Nesse contexto, essas serpentes exibem um grande interesse médico em despeito dos amplos acidentes ofídicos ocorridos principalmente em áreas tropicais e subtropicais. Conforme o banco de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde, na região centro-oeste há majoritariamente envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*, totalizando 6.619 notificações dos três últimos anos, enquanto que *Crotalus* obtiveram apenas 933 (Figura 1).

Os efeitos farmacológicos do envenenamento são dependentes de dois fatores: a toxicidade intrínseca e a quantidade de veneno injetado. Em geral, as manifestações clínicas abrangem paralisia neuromuscular, hemorragia e coagulopatia, edema local, bolhas e necrose do tecido muscular (KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006; CASEWELL *et al.*, 2020).

O veneno de serpente apresenta como uma novidade adaptativa por meio de uma transição de um meio mecânico (constricção) para um meio químico (veneno) com o propósito de imobilizar e digerir as presas (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; LOMONTE; RANGEL, 2012; AGUIAR *et al.*, 2019). Evolutivamente, a toxicidade do

veneno mediante a seleção natural recrutou genes ancestrais que codificavam proteínas atóxicas e, ao longo da linhagem evolutiva processos de duplicação e divergência culminaram em uma neofuncionalização, ou seja, o surgimento de toxinas potentes capazes de interferir nos processos fisiológicas da presa (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011; BRAHMA *et al.*, 2015).

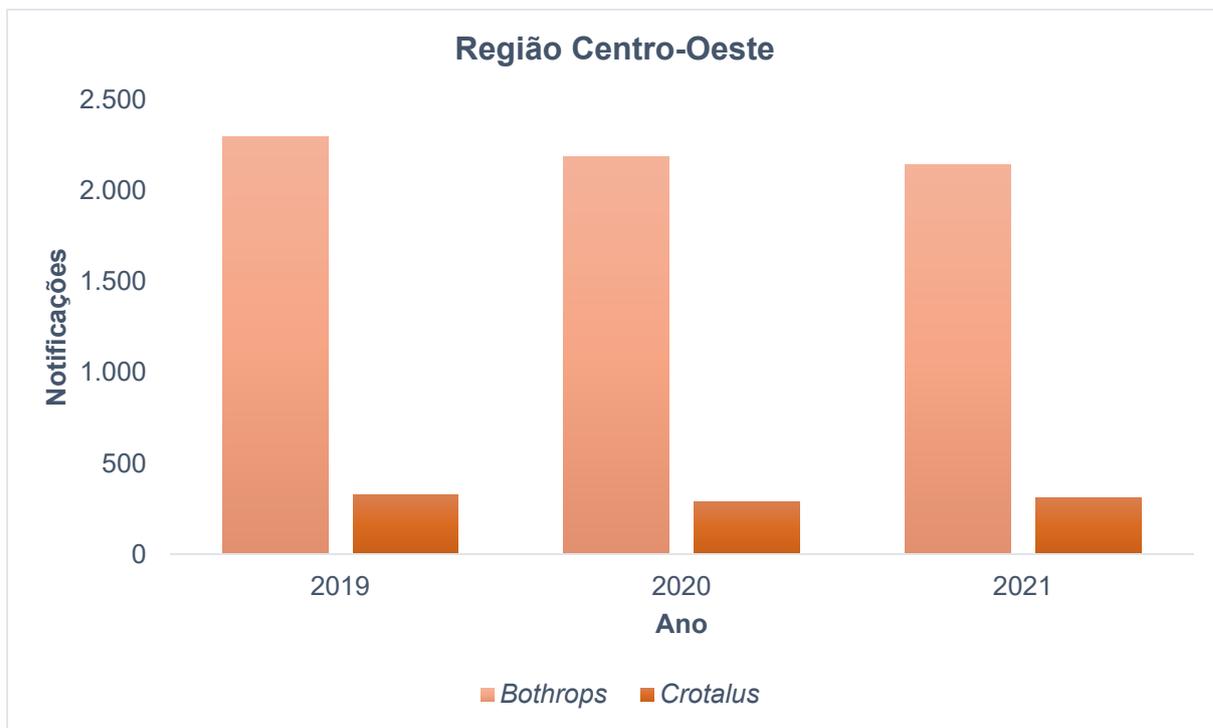


Figura 1. Notificações de acidentes ofídicos por serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* na região Centro-Oeste nos últimos três anos. Adaptado do SINAN (2022).

No aspecto composicional, o veneno é uma mistura complexa de proteínas, peptídeos, enzimas, toxinas, lipídios e cátions inorgânicos que detêm uma extensa pluralidade de atividades biológicas em um organismo (GOSWAMI; SAMANT; SRIVASTAVA, 2014; D'AMÉLIO *et al.*, 2021). Entretanto, essa composição está sujeita a uma heterogeneidade fundamentada em mecanismos genéticos e ambientais que agindo em conjunto resulta em uma plasticidade fenotípica adaptativa. Este dinamismo evolutivo é uma temática amplamente estudada ocorrendo em níveis taxonômicos mais elevados e intraespecificamente, abordando fatores de variação como distribuição geográfica, ontogenia, sexo, dieta, sazonalidade, manutenção em cativeiro, frequência de extração e até processamento (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; MODAHL; DOLEY; KINI, 2010; BRAHMA *et al.*, 2015; AMAZONAS *et al.*, 2019). A variação qualitativa e quantitativa do veneno gera um impacto na eficácia do diagnóstico e tratamento dos casos de envenenamento, ocasionando uma

instabilidade na produção de soro antiofídico (FRANCISCHETTI *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2018; CASEWELL *et al.*, 2020).

As técnicas “ômicas” (genômica, proteômica e transcriptômica) foram importantes para um estudo mais aprofundado da composição do veneno e o termo “Venômica” foi cunhado para referir-se à catalogação de todas as toxinas e genes envolvidos na toxicidade (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; BRAHMA *et al.*, 2015; AMORIM *et al.*, 2018; MODAHL *et al.*, 2019). Essas abordagens colaboraram para a determinação completa da composição do veneno, compreensão dos pontos de diversidade que fornecem informações sobre a história evolutiva das serpentes, identificação de novas toxinas que podem ser ferramentas para o desenvolvimento de agentes terapêuticos e auxílio na previsão de manifestações clínicas de envenenamento (BRAHMA *et al.*, 2015; ABD EL-AZIZ; SOARES; STOCKAND, 2020).

As enzimas exercem uma função importante na atividade do veneno das serpentes e estão envolvidas em uma série de implicações fisiopatológicas. Dentre as mais comuns estão as metaloproteases, fosfolipases, serinoproteases, L-aminoácido oxidases, acetilcolinesterases, nucleotidasas (5'-nucleotidasas, ATPases, fosfodiesterases e DNases) e hialuronidasas (KANG *et al.*, 2011).

1.1. Fosfolipases

As fosfolipases são uma classe de enzimas hidrolases ubíquas que atuam no metabolismo e regulação dos fosfolipídios presentes nas membranas celulares, além da sinalização, digestão, processos inflamatórios e até desempenham uma função na patogênese e virulência microbiana (KOHLENER *et al.*, 2006; JIA *et al.*, 2017; TEIXEIRA *et al.*, 2020). A classificação em A₁, A₂, B, C e D é conforme seu sítio de clivagem no substrato (Figura 2) (PAULA *et al.*, 2009; CEDRO *et al.*, 2018; STÁBELI *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2020). As enzimas fosfolipases A (PLA) hidrolisam o fosfolipídio na posição 1-acil-éster (PLA₁) ou 2-acil éster (PLA₂), enquanto que, as fosfolipases C (PLC) e D (PLD), clivam ligações fosfodiéster. A fosfolipase B (PLB) presente em alguns organismos como os fungos, em exemplificação, hidrolisa ambos os grupos acil resultando na produção acumulada de lisofosfolipídio (KOHLENER *et al.*, 2006; STÁBELI *et al.*, 2012).

As PLA₂s são a categoria mais comum no ambiente, classificadas basicamente em intracelulares e extracelulares. As intracelulares estão envolvidas no metabolismo

de fosfolipídios das membranas e outras funções metabólicas celulares. Em contrapartida, as extracelulares estão presentes nos sucos pancreáticos de mamíferos, venenos de alguns invertebrados e serpentes (ARNI; WARD, 1996). Sua função está vinculada na hidrólise específica da ligação 2-acil-éster na posição sn-2 da estrutura do glicerol e liberando como produtos os lisofosfolipídios e ácidos graxos (KINI; EVANS, 1989; KINI, 2003; LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011; QUACH; ARNOLD; CUMMINGS, 2014; CEDRO *et al.*, 2018). Por sua vez, os produtos podem gerar segundos mensageiros importantes como o ácido araquidônico, um precursor dos eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina e leucotrienos) envolvido em uma série de atividades fisiológicas (ARNI; WARD, 1996; SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004; PAULA *et al.*, 2009).

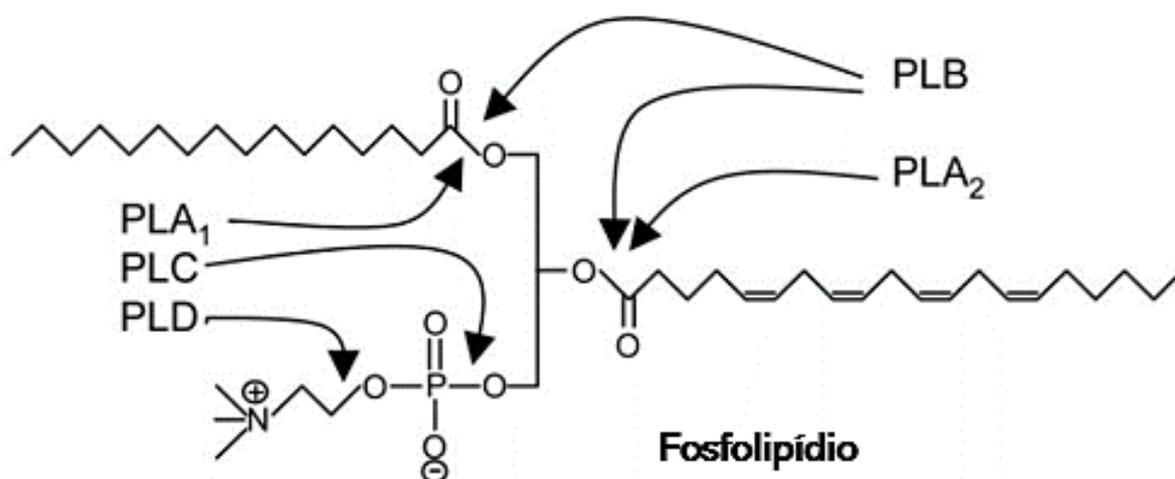


Figura 2. Sítios de ação das fosfolipases. Adaptado de Kholer *et al.* (2006).

Coletivamente, compõem um conjunto categorizado em seis classes conforme sua estrutura, mecanismo catalítico, fonte e história evolutiva (QUACH; ARNOLD; CUMMINGS, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2020) (Quadro 1). As sPLA₂s representam a categoria mais diversificada envolvida em uma ampla abundância de atividades biológicas e exigindo a presença de Ca²⁺ como um cofator essencial para a catálise dos fosfolipídios (KANG *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2020). Em serpentes, a PLA₂ integra uma variedade de resíduos de cisteína que formam ligações dissulfeto estabilizando sua estrutura tridimensional o que a torna termoestável, além de possuir uma baixa massa molecular e uma rede catalítica conservada composta por quatro resíduos de aminoácidos, His48, Asp49, Tyr52 e Asp99 (PAULA *et al.*, 2009; LOMONTE *et al.*, 2009; JIA *et al.*, 2017; CEDRO *et al.*, 2018). Quanto à forma de

estado, as PLA₂s estão sob formas monoméricas e, em alguns casos, como complexos entre os componentes constituintes da enzima, tal como a crotoxina da espécie *Crotalus durissus*, ou com outras proteínas por meio de interações covalentes ou não covalentes (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

Quadro 1. Classes de fosfolipase A₂.

| Classe | Abreviatura |
|---------------------------------------------------|--------------------|
| PLA ₂ citosólica | cPLA ₂ |
| PLA ₂ independente de cálcio | iPLA ₂ |
| PLA ₂ secretora | sPLA ₂ |
| PLA ₂ lisossomal | LyPLA ₂ |
| Fator de ativação plaquetária acetil-hidrolases | PAF-AH |
| PLA ₂ específica para o tecido adiposo | AdPLA ₂ |

Sob um aspecto evolutivo, as enzimas PLA₂ de serpentes foram submetidas a um processo de evolução acelerada que permitiu adaptações nas funções realizadas pelo veneno que inclui não somente na digestão do alimento, como também na toxicidade que resulta em um vasto espectro de efeitos farmacológicos (KINI, 2003). A toxina surgiu por intermédio do recrutamento independente de duas linhagens ancestrais de PLA₂ relacionadas, porém estruturalmente distintas: família Elapidae (Grupo I) e família Viperidae (Grupo II). Houve uma submissão à seleção natural, provocando o aparecimento de mutações e convertendo sua característica não tóxica em toxinas potentes de alta atividade fisiopatológica (LOMONTE *et al.*, 2009; LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011). Dessa forma, esses eventos evolutivos exemplifica um caso de evolução convergente (Figura 3) (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011; LOMONTE; RANGEL, 2012; FERNANDES *et al.*, 2014).

Os fatores genéticos e evolutivos são fundamentais para a existência de um grande número de isoformas de toxinas, o que favorece a variabilidade existente na composição do veneno das serpentes (CASEWELL *et al.* 2020). As isoformas de PLA₂ diferem quanto ao seu ponto isoelétrico, caracterizando em ácido, básico ou neutro, sequência de aminoácidos e, ainda, em alguns casos, em sua capacidade de agrupamento em multímeros (JIA *et al.*, 2017). PLA₂s de serpentes do grupo II possuem variantes ácidas e básicas, sendo que as mais recorrentes são os dois subtipos básicos, a Asp49 e Lys49 (OBANDO *et al.* 2014; JIA *et al.*, 2017). Outras variantes na posição 49 foram relatadas como Ser, Arg, Asn ou Gln (LOMONTE *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2020). A forma variante Asp49-PLA₂

retrata uma atividade enzimática enquanto que a Lys49-PLA₂ é praticamente inativa para a atividade catalítica (SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004; OBANDO *et al.* 2014).

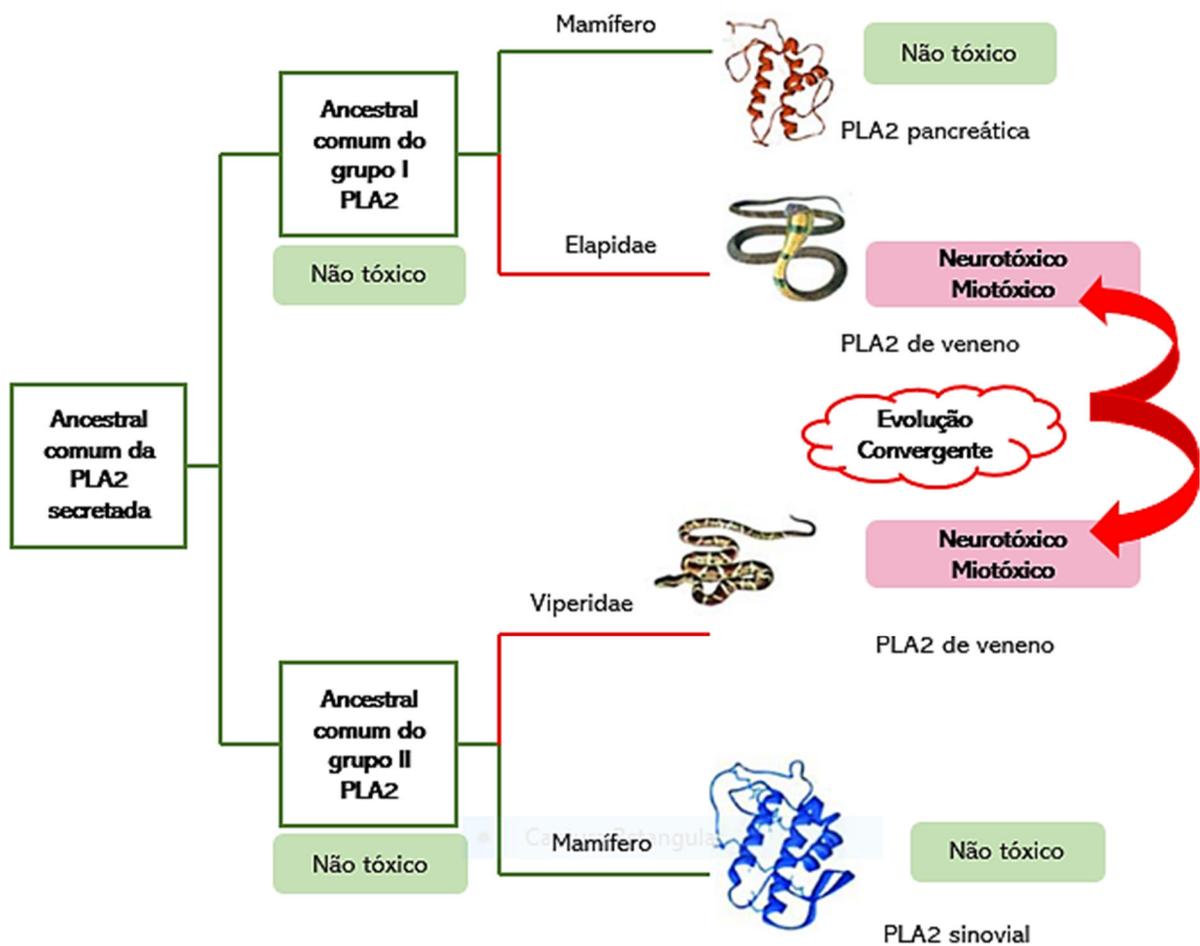


Figura 3. Evolução convergente das atividades tóxicas das fosfolipases A₂ (PLA₂) do veneno de serpentes em Elapidae e Viperidae. Adaptado de Lomonte e Gutiérrez (2011).

Predominantemente, a toxicidade de uma proteína PLA₂ está vinculada ao seu caráter básico devido, provavelmente, à frequência de resíduos de aminoácidos de carga positiva (Lys e Arg) em sua estrutura (KINI, 2003; PAULA *et al.*, 2009; LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011). Asp49-PLA₂ possui atividade catalítica dependente do íon cofator Ca²⁺, diferentemente da Lys49-PLA₂ que é incapaz de se ligar ao cofator essencial e, portanto, apresentam baixa atividade enzimática ou ausente (LEITE *et al.*, 2004; STÁBELI *et al.*, 2012; CEDRO *et al.*, 2018). Não obstante, esta última induz toxicidade relacionada a um grupo de resíduos de aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos localizados na região C – terminal, o segmento 115-129 (LOMONTE *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2020). Essas duas variantes podem coexistir em espécies de viperídeos contribuindo em conjunto para o efeito patológico, isso propicia um

importante valor adaptativo para as serpentes (OBANDO *et al.* 2014; BUSTILLO *et al.*, 2019).

Há uma diversidade de efeitos farmacológicos importantes para o campo médico proveniente dessas enzimas (KINI; EVANS, 1989; KINI, 2003; DOLEY; ZHOU; KINI, 2010; LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011). Em envenenamentos foram relatados a indução de efeito miotóxico, neurotóxico, hemolítico, citotóxico, anticoagulante, edematogênico, inibição ou ativação da agregação plaquetária, efeitos bactericidas e pró-inflamatórios (STÁBELI *et al.*, 2012; CEDRO *et al.*, 2018; D, AMÉLIO *et al.*, 2021). Alguns dos efeitos podem ser estimulados de forma dependente ou não da atividade enzimática (KINI, 2003; JIA *et al.*, 2017; D, AMÉLIO *et al.*, 2021). Nos mecanismos dependentes da catálise, a hidrólise provocada pela enzima PLA₂ libera os produtos que podem desencadear os efeitos farmacológicos. Por outro lado, há o mecanismo o qual a ligação da enzima na proteína-alvo pode resultar também nesses efeitos (KINI, 2003).

É importante elucidar que nem todas as enzimas PLA₂ exibem os efeitos farmacológicos, algumas induzem efeitos específicos em locais já pré-determinados. Foi proposto um modelo alvo e especificação farmacológica o qual há locais-alvo na membrana celular que são complementares aos sítios farmacológicos específicos na PLA₂, possibilitando um reconhecimento e alta afinidade para a ligação. Há uma probabilidade de que proteínas de membrana, as glicoproteínas, operam como componentes alvo designando uma ligação específica das PLA₂s. Portanto, o modelo de interação exposto é estilo proteína-proteína (KINI; EVANS, 1989).

A ação enzimática em um sítio específico no substrato por sua fosfolipase correspondente resulta em mudanças físicas que podem ser utilizadas para a dosagem da enzima. Ademais, alguns parâmetros são importantes para a medição da fosfolipase, tais como a temperatura, pH, concentração do substrato, seleção dos agentes de apoio, tempo de incubação e disponibilidade de íons cofatores para a atividade catalítica (HABERMANN; HARDT, 1972). Diversos ensaios de dosagem fosfolipásica foram desenvolvidos como um aparato na pesquisa científica.

1.1.1. Ensaios de dosagem fosfolipásica

A seleção de um ensaio enzimático está associada a alguns aspectos como o grau de sensibilidade requisitada, disponibilidade do substrato, especificidade da

enzima, presença de reações colaterais incompatíveis, automação, entre outros. Cada ensaio possui um limite de detecção enzimática, o qual indica a sensibilidade geral que por sua vez depende da quantidade de enzima disponível e de sua atividade específica. Um ensaio extremamente sensível significa que este pode detectar fosfolipases de origem intracelular, pois há uma quantidade mínima quando comparados com outras fontes como veneno de serpente ou pâncreas de mamíferos. Outra questão relevante é o uso de alguns ensaios para enzimas purificadas, porém incompatíveis com sistemas brutos e, vice-versa (REYNOLDS *et al.*, 1991).

O ensaio de titulação pH-stat consiste na titulação de um dos produtos da hidrólise, os ácidos graxos, o qual a atividade enzimática pode ser calculada por intermédio da quantidade de reagente alcalino utilizado para neutralizar a reação. Os ácidos graxos são extraídos por solventes como o clorofórmio e metanol, contudo, a problemática é decorrente da extração de fosfolipídio dificultando a determinação dos ácidos graxos livres (BOSCH; AARSMAN, 1979). Dole (1956) desenvolveu uma metodologia rápida de extração envolvendo camadas de heptano/isopropanol-água em seu estudo de determinação da concentração de ácidos graxos não esterificados em plasma, apontando o heptano como um solvente mais adequado pela facilidade de retirada da fase que contém lipídios e o álcool isopropílico em reunir o heptano e água em um estado monofásico. Em suma, o pH-stat é um ensaio relativamente simples e testado para outras categorias de fosfolipase como C e D, contudo, não possui funcionalidade para estudos que visam a detecção de fosfolipases A intracelular (REYNOLDS *et al.*, 1991).

A espectrofotometria é um método de análise de densidade óptica mais utilizado em laboratório. Alguns ensaios de fosfolipase utilizam substrato sintético cromogênico (HOLZER; MACKESY, 1996) ou um substrato fluorescente (HENDRICKON; RAUK, 1981), monitoramento contínuo da alteração de pH por meio de um indicador (ARAÚJO; RADVANYI, 1987), observação da diminuição de turbidez de uma emulsão de fosfolipídios (MARINETTI, 1965) e medição da liberação de hemoglobina dos eritrócitos (HABERMANN; HARDT, 1972). Em geral, são ensaios mais visados por serem relativamente rápidos e podem se adequar para um grande número de amostras (REYNOLDS *et al.*, 1991).

Posto que os procedimentos radiométricos sejam raramente aplicados em laboratório devido as condições limitadas, são os ensaios de maior sensibilidade. Sob

o uso de substratos radioativos, a separação dos produtos radiomarcados pode ser efetuada por solventes como clorofórmio/metanol e um processo cromatográfico em camada fina (TLC) ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para que possa ocorrer a mensuração da radioatividade dos produtos da hidrólise. São processos extremamente delicados, laboriosos e de longa duração, o que o torna menos aplicado em laboratórios que realizam muitos ensaios de rotina (BOSCH; AARSMAN, 1979).

Reynolds *et al.* (1991) citou alguns ensaios raramente relatados em estudos como o de monocamada, polarográfico, siblinks, fosfato, sabonete de ácido graxo, acoplado a CoA, acoplado a plasmalógeno e de ressonância de spin de elétron. No primeiro são formadas monocamadas de fosfolipídios e a atividade é mensurada pela diminuição da área de superfície do fosfolipídio que é necessária para a manutenção constante da pressão superficial. O ensaio polarográfico usa uma reação acoplada com lipoxigenase de soja, monitorando a absorção de oxigênio após a oxidação dos produtos de ácidos graxos por esta família enzimática. No ensaio de ressonância de spin de elétron, um substrato de fosfolipídio, o 1-palmitoil-2-(4 doxilpentanoil) glicerofosfocolina, é marcado com uma sonda de spin e há um monitoramento da mudança no sinal espectral do ácido 4-doxilpentanoico após a hidrólise do substrato.

Os demais ensaios são considerados espectrofotométricos que envolvem, respectivamente: o uso de um substrato sintético denominado Siblinks contendo p-nitrofenol ligado à posição correspondente a ação enzimática da PLA₂ e sua hidrólise acarretando na liberação de ácido graxo livre que cicliza e elimina um componente de fácil detecção espectrofotométrica, o p-nitrofenóxido; o ensaio fosfato em conjunto com o ensaio TLC quando os fosfolipídios radiomarcados não estão disponíveis; a formação de sabões de Co²⁺ pela incubação dos ácidos graxos extraídos com uma solução aquosa de nitrato de cobalto que, posteriormente, são extraídos para uma fase orgânica e a quantidade de cobalto determinado por uma reação colorimétrica; a acoplação ao metabolismo da coenzima A; e a hidrólise de plasmalogênio produzindo um produto lisoplasmalogênio que é hidrolisado pela lisoplasmalogenase em glicerofosfocolina e um aldeído livre. Este último é reduzido pela álcool-desidrogenase com oxidação concomitante do NADH sendo que a reação é acompanhada espectrofotometricamente observando o desaparecimento do NADH.

Morikawa *et al.* (2007) relata um método que utiliza espectrometria de massa de ionização por eletrospray (ESI-MS) para a testagem de PLA₁, quantificando os ácidos

graxos livres sem necessitar de substratos fluorescentes ou radiomarcados. Este ensaio pode ser aplicado também para PLA₂ e, além disso, detecta uma variedade de atividade fosfolipásica mediante o uso de dois ou mais fosfolipídios de diferentes composições de ácidos graxos como substratos.

Por conseguinte, a padronização de ensaios bioquímicos para a dosagem de atividade fosfolipásica nos venenos de serpentes, apresenta-se como fundamental para a caracterização e comparatividade dessas enzimas. Considerando o elevado grau de importância dos ensaios aplicados em laboratórios para o desenvolvimento contínuo da pesquisa científica, é primordial a contribuição para a área de biologia experimental padronizando ensaios de dosagem de um dos principais componentes dos venenos das serpentes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Padronizar ensaios para a dosagem de atividade fosfolipásica em veneno de serpentes para um perfil “screening” voltado para o Laboratório de Toxinologia do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da PUC Goiás.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar uma concentração máxima de substrato e veneno para os ensaios descrito por Marinetti (1965) e Gutiérrez, Ownby e Odell (1984).
- Mensurar a atividade fosfolipásica do veneno das serpentes.
- Estabelecer um paralelo entre os ensaios de dosagem fosfolipásica.
- Realizar um ensaio de dosagem fosfolipásica complementar.
- Analisar comparativamente a atividade fosfolipásica das amostras de veneno das diferentes espécies.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostra de veneno

Foram utilizadas amostras de veneno (pool) de *Bothrops moojeni* (BM), *Bothrops alternatus* (BA), *Bothrops jararacussu* (BJS), *Bothrops atrox* (BAT) e *Crotalus durissus collilineatus* (CD) depositadas e conservadas no Banco de Venenos do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas (CEPB) da PUC Goiás. As amostras liofilizadas/cristalizadas estavam contidas em tubos de medida aproximada de 5 cm e conservadas à temperatura de -20°C. Cada tubo estava rotulado para a identificação da espécie.

3.2. Dosagem de substrato

Foi realizada uma curva padrão do substrato (emulsão de gema de ovo) para determinar a máxima absorbância pelo aparelho espectrofotométrico Biospectro SP-220. Uma diluição seriada em PBS (1,37 mM NaCl, 26,8 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 17,6 mM KH₂PO₄, pH 7,4) foi executada a partir da concentração 200 mg/ml à 1,56 mg/ml e a absorbância lida à 925 nm zerando o aparelho com PBS.

3.3. Atividade fosfolipásica pelo ensaio turbidimétrico

O ensaio é baseado de acordo com o descrito por Marinetti (1965) pelo clareamento da gema de ovo.

3.3.1. Teste de variação do substrato

Para a determinação de uma concentração ideal de substrato para este ensaio, realizou-se uma diluição seriada da gema de ovo em Tris HCl 0,1 mM pH 8,0 a partir da concentração de 10 mg/ml à 0,625 mg/ml. Em seguida, foi adicionado 750 µL da emulsão em uma cubeta e a absorbância foi lida à 925 nm zerando o aparelho com tampão Tris. Após a leitura e registro da absorbância do substrato, foi adicionado 50 µL da amostra de veneno de *B. moojeni* (1 mg/ml) cronometrando 5 minutos para o registro da absorbância final. A atividade enzimática específica corresponde à quantidade de enzima capaz de causar um decréscimo de 0,01 unidades de absorbância.

3.3.2. Teste de variação do veneno

Para a determinação de uma concentração ideal de veneno para este ensaio, foi feita uma diluição seriada do veneno de *B. moojeni* em PBS a partir da concentração de 4 mg/ml à 0,125 mg/ml. Em uma cubeta, foi adicionado 750 µL da emulsão de gema de ovo na concentração identificada no ensaio anterior e a absorbância foi lida à 925 nm zerando o aparelho com tampão Tris. Após a leitura e registro da absorbância do substrato, foi adicionado 50 µL da amostra de veneno cronometrando 5 minutos para o registro da absorbância final. A atividade enzimática específica corresponde à quantidade de enzima capaz de causar um decréscimo de 0,01 unidades de absorbância.

3.3.3. Teste de variação interespecífica

Após a determinação das concentrações máximas de substrato e veneno, o ensaio foi repetido utilizando venenos de diferentes espécies: *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. atrox* e *C.d. collilineatus*. Em uma cubeta, foi adicionado 750 µL da emulsão de gema de ovo e a absorbância foi lida à 925 nm zerando o aparelho com tampão Tris. Após a leitura e registro da absorbância do substrato, foi adicionado 50 µL da amostra de veneno cronometrando 5 minutos para o registro da absorbância final. A atividade enzimática específica corresponde à quantidade de enzima capaz de causar um decréscimo de 0,01 unidades de absorbância.

3.4. Atividade fosfolipásica pelo ensaio de hemólise indireta em tubo

O ensaio é baseado de acordo com o descrito por Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) com algumas modificações.

3.4.1. Teste de variação do substrato

Para a determinação de uma concentração ideal de substrato para este ensaio, foi feita uma diluição seriada da gema de ovo em PBS a partir da concentração de 25 mg/ml à 0,78125 mg/ml. O ensaio foi empregado em tubos contendo 400 µL de PBS, 250 µL de emulsão de ovo, 500 µL de uma suspensão de eritrócitos humanos 2,5% previamente lavados em PBS, 50 µL de solução de CaCl₂ 10 mM e 50 µL da amostra de veneno de *B. moojeni* (1 mg/ml). Um tubo branco foi preparado como controle negativo, porém substituindo-se o volume correspondente às amostras por PBS. Os

tubos foram incubados à 37°C durante 30 minutos e, logo após, as reações foram interrompidas com a adição de 50 µL de EDTA 100 mM. Todos os tubos de reação foram centrifugados durante 5 minutos e a absorbância dos sobrenadantes foi medida em 540 nm. A atividade específica foi definida como a quantidade de enzima que provocou o aumento de 0,001 unidade de absorbância por mg de veneno.

3.4.2. Teste de variação do veneno

Para a determinação de uma concentração ideal de veneno para este ensaio, foram utilizadas as concentrações do veneno de *B. moojeni* de 0,125 mg/ml à 4 mg/ml. O ensaio foi empregado em tubos contendo 400 µL de PBS, 250 µL de emulsão de gema de ovo na concentração identificada, 500 µL de uma suspensão de eritrócitos humanos 2,5% previamente lavados em PBS, 50 µL de solução de CaCl₂ 10 mM e 50 µL da amostra de veneno. Um tubo branco foi preparado como controle negativo, porém substituindo-se o volume correspondente às amostras por PBS. Os tubos foram incubados à 37°C durante 30 minutos e, logo após, as reações foram interrompidas com a adição de 50 µL de EDTA 100 mM. Todos os tubos de reação foram centrifugados durante 5 minutos e a absorbância dos sobrenadantes foi medida em 540 nm. A atividade específica foi definida como a quantidade de enzima que provocou o aumento de 0,001 unidade de absorbância por mg de veneno.

3.4.3. Teste de variação interespecífica

Após a determinação das concentrações máximas de substrato e veneno, o ensaio foi repetido utilizando venenos de diferentes espécies: *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. atrox* e *C.d. collilineatus*. Em tubos, foram adicionados 400 µL de PBS, 250 µL de emulsão de ovo, 500 µL de uma suspensão de eritrócitos humanos 2,5% previamente lavados em PBS, 50 µL de solução de CaCl₂ 10 mM e 50 µL da amostra de veneno. Um tubo branco foi preparado como controle negativo, porém substituindo-se o volume correspondente às amostras por PBS. Os tubos foram incubados à 37°C durante 30 minutos e, logo após, as reações foram interrompidas com a adição de 50 µL de EDTA 100 mM. Todos os tubos de reação foram centrifugados durante 5 minutos e a absorbância dos sobrenadantes foi medida em 540 nm. A atividade específica foi definida como a quantidade de enzima que provocou o aumento de 0,001 unidade de absorbância por mg de veneno.

3.5. Atividade fosfolipásica pelo ensaio de hemólise indireta em placa

Um ensaio de hemólise indireta em placa foi realizado de acordo com o descrito por Gutiérrez *et al.* (1988) com algumas modificações. Foram utilizadas as concentrações do veneno de *B. moojeni* a partir de 0,0625 mg/ml à 1 mg/ml. A placa de agarose 1% foi preparada com 2,5 ml de eritrócitos humanos previamente lavados em PBS, 2,5 ml de emulsão de gema de ovo à 250 mg/ml, 0,5 ml de solução de CaCl₂ 10 mM e azida sódica. Após a solidificação do gel, 8 µL das amostras foram aplicadas em orifícios de 2 mm de diâmetro, seguido de incubação à 37 °C durante 20h. Como controle, foi testado 8 µL de solução PBS. A atividade enzimática é determinada pela medição do diâmetro dos halos em centímetros.

3.6. Análise estatística

Todos os ensaios foram executados em triplicata e os dados são apresentados como média ± desvio padrão (SD) e em gráficos com o auxílio do software OriginPro® versão 7.0.

A análise de variância unidirecional (ANOVA One-Way) foi empregada mediante o software Jamovi versão 2.3.7, seguida do teste de Tukey ou Games-Howell para comparar a atividade fosfolipásica das amostras de veneno das diferentes espécies. Os dados foram expressos como média ± SD. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As fosfolipases são enzimas lipolíticas abundantes nos organismos, estando presentes intracelularmente, em secreções celulares ou associadas às membranas biológicas. De forma geral, há dois conjuntos: as acilhidrolases (PLA₁, PLA₂ e PLB) e as fosfodiesterases (PLC e PLD) (ALOULOU *et al.*, 2018). O veneno de serpente contém principalmente enzimas PLA₂ que além de contribuir para o papel digestivo, induz uma seriedade de efeitos farmacológicos em vítimas de envenenamento (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

O substrato alvo para a ação enzimática utilizado nos ensaios foi uma emulsão de gema de ovo, um substrato natural que fornece nutrientes essenciais (proteínas, lipídios, vitaminas e minerais) para a fase embrionária de um organismo ovíparo. Esta é dividida em quatro frações: uma de baixa densidade (70%), uma de baixa densidade do grânulo¹ (4%), uma hidrofílica (8%) e a de fosvitina-lipovitulina² (18%). A fração correspondente a de baixa densidade possui um alto teor de lipídios constituídos principalmente de triacilglicerol (TAG), fosfolipídio e colesterol. As classes de fosfolipídios integram majoritariamente a fosfatidilcolina (PC - 70%), seguida por fosfatidiletanolamina (PE - 24%), esfingolipídio (4%), fosfatidilserina (PS - 1%) e fosfatidilinositol (PI - 1%) (ABOUSALHAM; VERGER, 2000; ANTON, 2007).

A gema de ovo por ser um substrato rico em lipídios, de fácil acessibilidade e barato, tornou-se uma opção viável para vários ensaios de fosfolipase. Alguns estudos utilizam fosfatidilcolina purificada, um produto comercial. Primeiramente, realizou-se uma dosagem de substrato com o intuito de aferir uma concentração máxima pelo aparelho espectrofotométrico Biospectro SP-220 para a realização posterior dos ensaios enzimáticos. Verificou-se que a capacidade máxima de absorvância pelo aparelho é de até 2,5 UA. Nesse caso, concentrações muito altas como 100 e 200 mg/ml atingiram a capacidade máxima e, dessa forma, poderíamos considerar as concentrações de 25 ou 12,5 mg/ml para a execução dos ensaios (Figura 4).

Para a determinação de uma concentração ideal tanto de substrato quanto de veneno, foram seguidos os ensaios de Marinetti (1965) e Gutiérrez, Ownby e Odell (1984).

¹ Partícula de gema.

² Concentração de proteína.

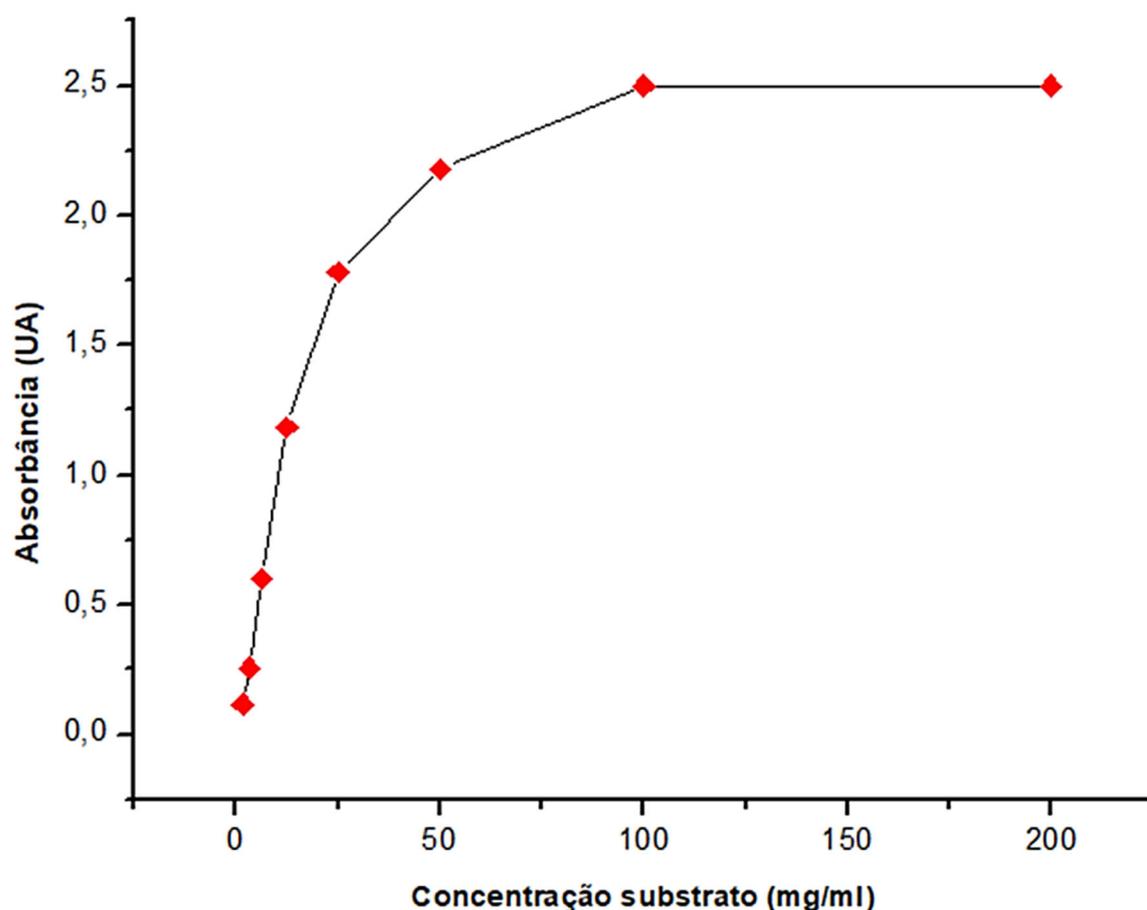


Figura 4. Curva padrão do substrato.

O ensaio de Marinetti (1965) resultou em uma concentração máxima de 2,5 mg/ml, pois concentrações acima embora obtivessem uma reação catalítica, não ocorria com uma velocidade máxima, uma vez que havia um excesso de substrato para uma quantidade limitada de enzima e, nesse caso, a enzima estaria sobrecarregada (Tabela 1) (Figura 5). Após o ponto de 2,5 mg/ml, é possível verificar graficamente a formação de uma tendência platô. Com o intuito de uniformizar a apresentação dos dados obtidos de ambos os ensaios para padronização, os gráficos também foram elaborados na configuração de função logarítmica expressando uma melhor observação em relação à concentração ideal para cada ensaio.

Tabela 1. Atividade enzimática pelo ensaio de Marinetti (1965) para a padronização do substrato.

| Concentração substrato (mg/ml) | Atividade enzimática (U/mg/min) |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 0,625 | 38,53 ± 1,62 |
| 1,25 | 95,07 ± 2,20 |
| 2,5 | 213,6 ± 1,06 |
| 5 | 398,4 ± 1,60 |
| 10 | 632,4 ± 1,06 |

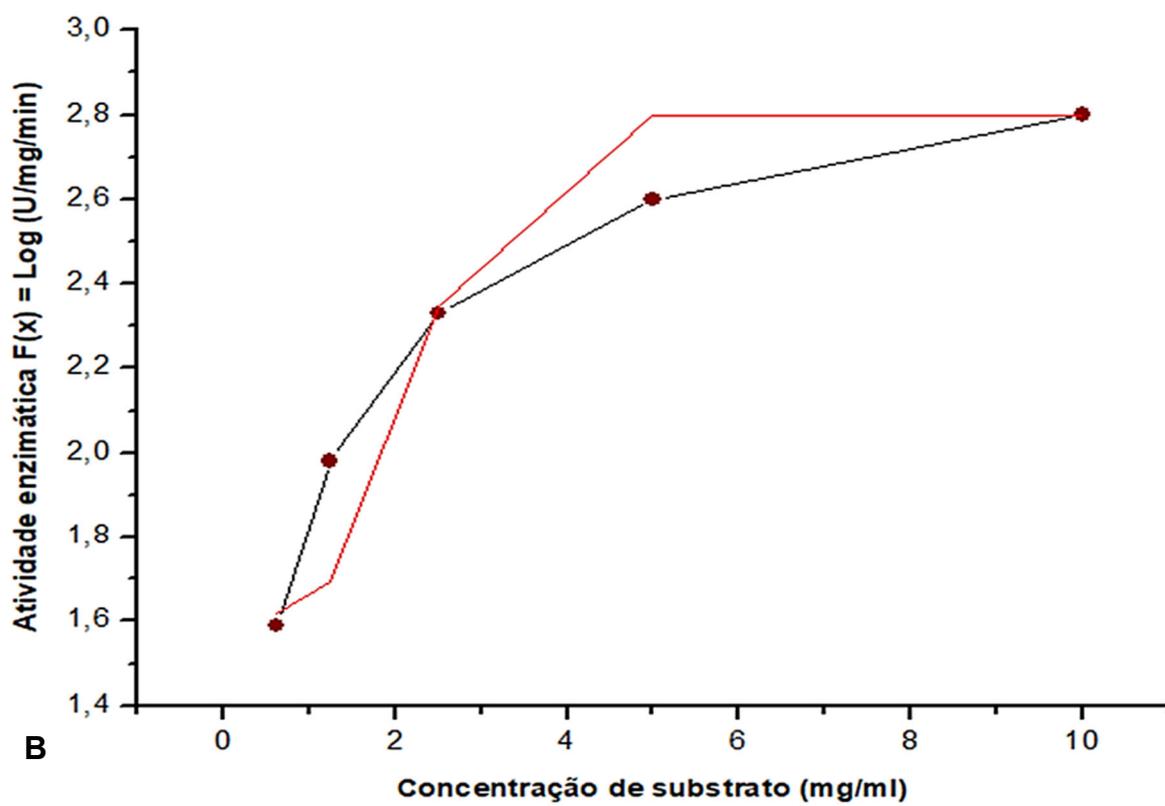
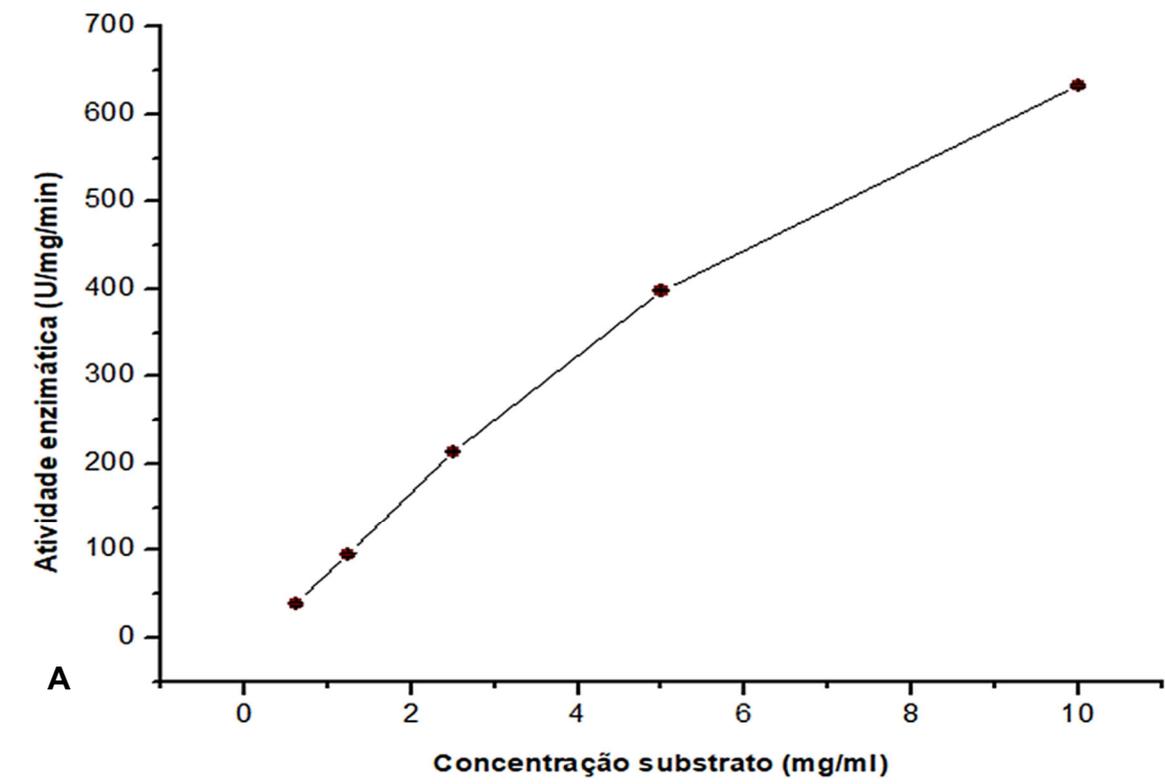


Figura 5. Atividade enzimática pelo ensaio de Marinetti (1965) para a padronização do substrato. (A) Representação da atividade enzimática em configuração normal. (B) Representação da atividade enzimática em configuração de função logarítmica acompanhada de uma curva dose-resposta (linha vermelha).

Ponderando o gráfico de Log, apesar de haver distinção entre as concentrações testadas, à medida em que a concentração do substrato se intensifica, o fator de diferenciação entre a atividade enzimática das concentrações tende a decrescer principalmente à partir de 2,5 mg/ml. A curva dose-resposta comumente utilizada na área da farmacologia para estabelecer a relação entre o efeito de diferentes doses de um composto em um organismo, pode funcionar como um outro parâmetro de observação da reação enzimática conforme o aumento da concentração de substrato. Consideramos graficamente a concentração de substrato como dose para obter uma resposta enzimática correspondente, seguindo o princípio central da curva dose-resposta. É possível constatar pelo comportamento da curva, um ponto coincidente em 2,5 mg/ml antes de entrar gradativamente em uma constante.

Marinetti (1965) por meio de um modelo de clareamento de gema de ovo, determinou a atividade fosfolipásica geral e confirmação por uma cromatografia em papel, uma vez que alguns reagentes utilizados no ensaio poderiam influenciar no clareamento da suspensão caso a enzima não estivesse presente, o que traria uma conclusão equivocada. Dessa forma, a diminuição da turbidez da suspensão foi acompanhada espectrofotometricamente.

O ensaio de Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) aponta o melhor ponto como 3,125 mg/ml para um aproveitamento máximo da reação enzimática. É possível verificar nos gráficos que uma tendência constante está em formação após a concentração de 3,125 mg/ml, significando que a velocidade de reação foi decrescendo (Tabela 2) (Figura 6).

O fator de diferenciação entre as atividades enzimáticas decresce ativamente no ponto de 3,125 mg/ml, embora haja diferenças entre as concentrações. As de 12,5 e 25 mg/ml estão muito próximas no quesito de reação enzimática ao observarmos o gráfico de Log. Ademais, a curva dose-resposta denota um ponto coincidente em 3,125 mg/ml previamente à formação de um platô.

Tabela 2. Atividade enzimática pelo ensaio de Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) para a padronização do substrato.

| Concentração substrato (mg/ml) | Atividade enzimática (U/mg) |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| 0,78125 | 4.040 ± 124,90 |
| 1,5625 | 11.473,33 ± 378,59 |
| 3,125 | 19.466,67 ± 415,85 |
| 6,25 | 28.073,33 ± 391,07 |
| 12,5 | 33.660 ± 249,80 |
| 25 | 35.706,67 ± 369,50 |

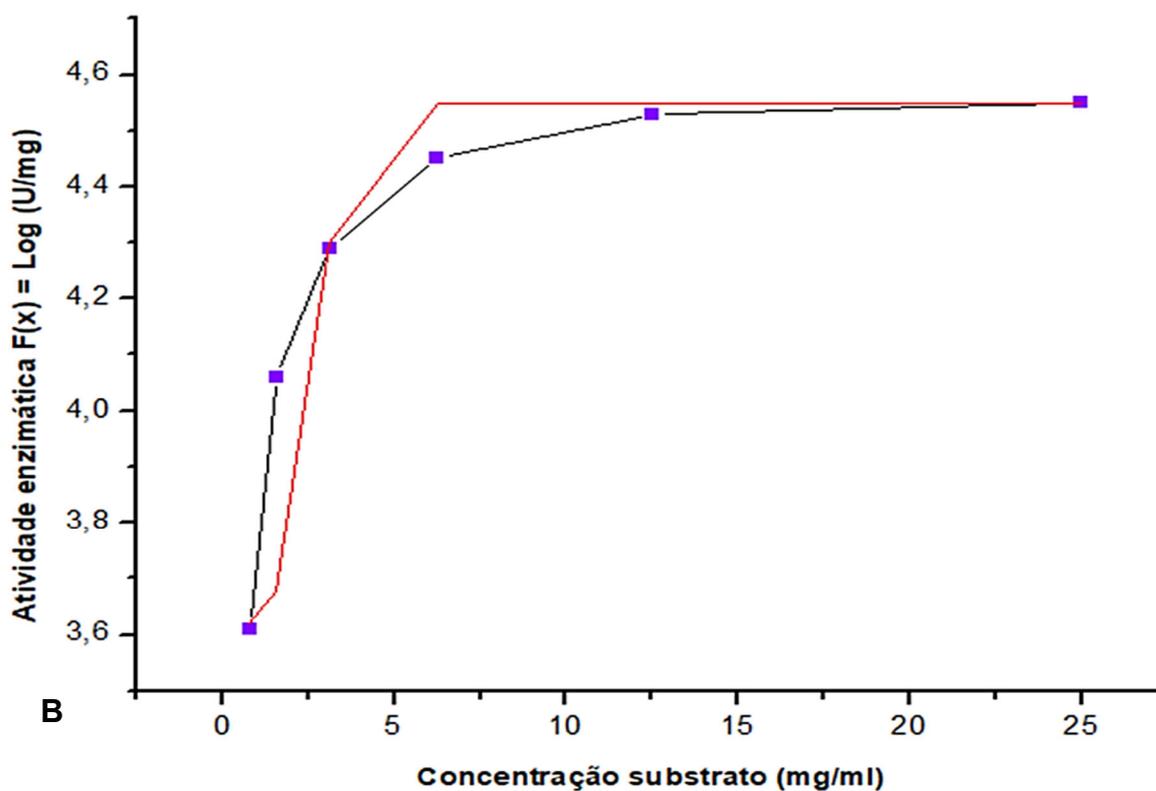
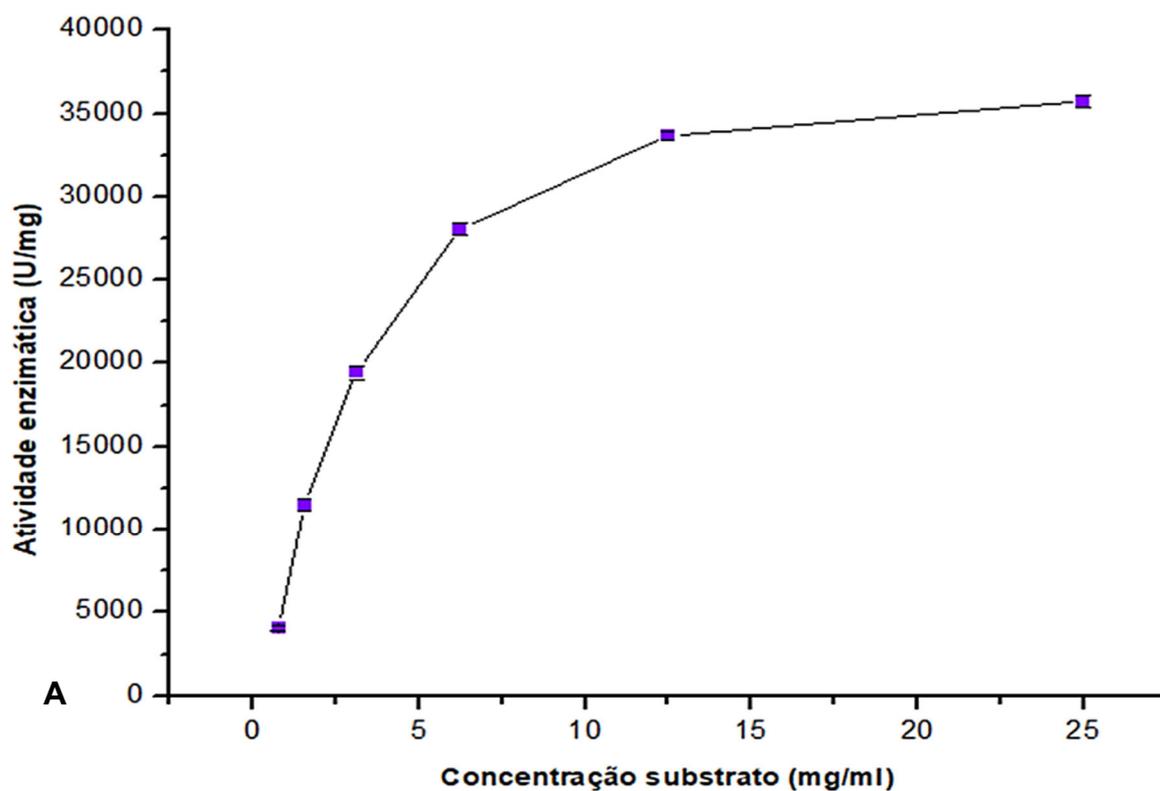


Figura 6. Atividade enzimática pelo ensaio de Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) para a padronização do substrato. (A) Representação da atividade enzimática em configuração normal. (B) Representação da atividade enzimática em configuração de função logarítmica acompanhada de uma curva dose-resposta (linha vermelha).

O princípio de Michaelis-Menten estabelece que conforme aumenta a concentração de substrato fixando a de enzima, a atividade sai do estado estacionário ampliando de forma hiperbólica até atingir uma velocidade máxima (V_{max}), o qual há uma saturação da enzima devido a formação do complexo enzima-substrato. A constante de Michaelis (K_m) é uma informação que é característica para cada enzima agindo sobre determinado substrato, então, tanto a V_{max} quanto K_m possuem especificidade para diferentes enzimas. Simplificando, a cinética de Michaelis-Menten aplica-se à maioria das enzimas com exceção de enzimas alostéricas e é principalmente indicada para ensaios com enzimas purificadas, o que não é o caso, visto que outros componentes do veneno podem influenciar na reação enzimática.

Após a padronização do substrato para ambos os ensaios, foi executada uma padronização do veneno utilizando como parâmetro o veneno de *B. moojeni*. O ensaio de Marinetti (1965) indica, principalmente no gráfico de Log, a estabilização da reação após 0,5 mg/ml (Tabela 3) (Figura 7).

Tabela 3. Atividade enzimática pelo ensaio de Marinetti (1965) para a padronização do veneno.

| Concentração veneno (mg/ml) | Atividade enzimática (U/mg/min) |
|-----------------------------|---------------------------------|
| 0,125 | 174,93 ± 2,27 |
| 0,25 | 187,73 ± 1,22 |
| 0,5 | 192,93 ± 0,23 |
| 1 | 198,4 ± 0,80 |
| 2 | 201,47 ± 0,23 |
| 4 | 201,2 ± 0,40 |

Tabela 4. Atividade enzimática pelo ensaio de Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) para a padronização do veneno.

| Concentração veneno (mg/ml) | Atividade enzimática (U/mg) |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 0,125 | 2.460 ± 121,66 |
| 0,25 | 4.533,33 ± 254,82 |
| 0,5 | 7.373,33 ± 332,47 |
| 1 | 11.380 ± 105,83 |
| 2 | 15.080 ± 113,14 |
| 4 | 16.466,67 ± 241,94 |

Em altas concentrações como 2 e 4 mg/ml, há uma saturação do complexo enzima-substrato formando-se um platô. No ensaio de Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) é possível inferir a mesma observação, sendo 0,5 mg/ml um ponto interessante para a atividade enzimática (Tabela 4) (Figura 8).

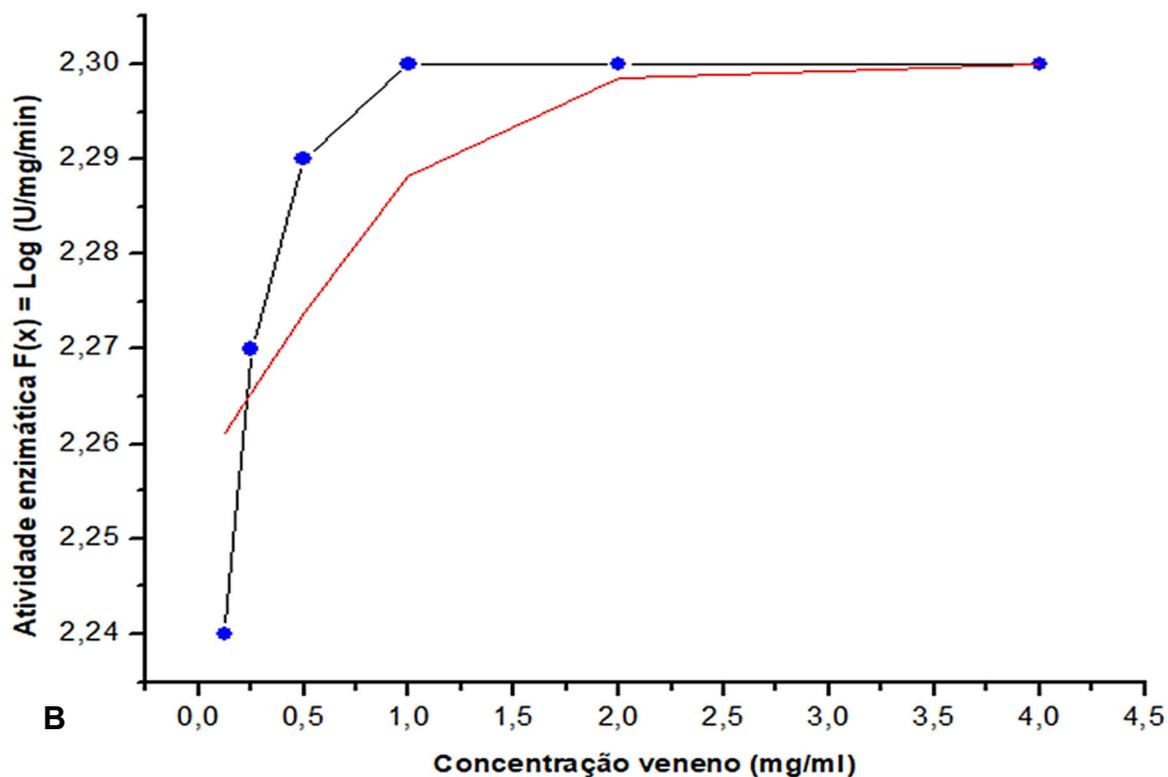
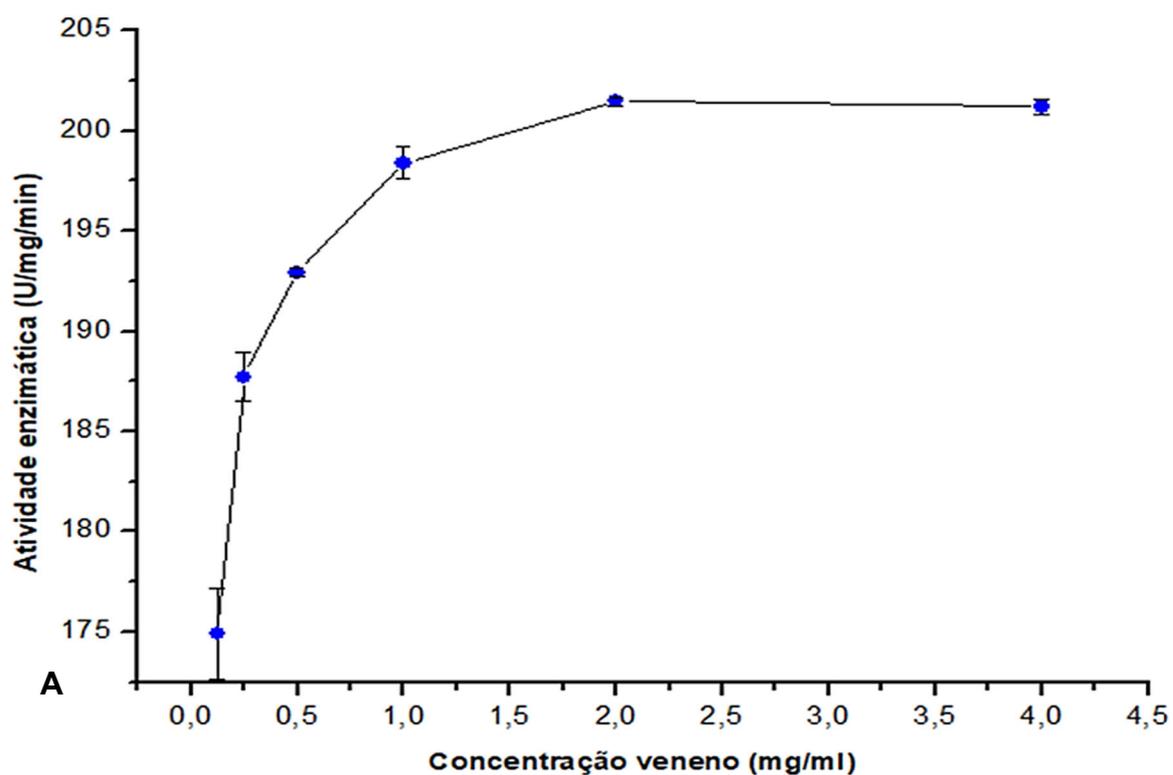


Figura 7. Atividade enzimática pelo ensaio de Marinetti (1965) para padronização do veneno. (A) Representação da atividade enzimática em configuração normal. (B) Representação da atividade enzimática em configuração de função logarítmica acompanhada de uma curva dose-resposta (linha vermelha).

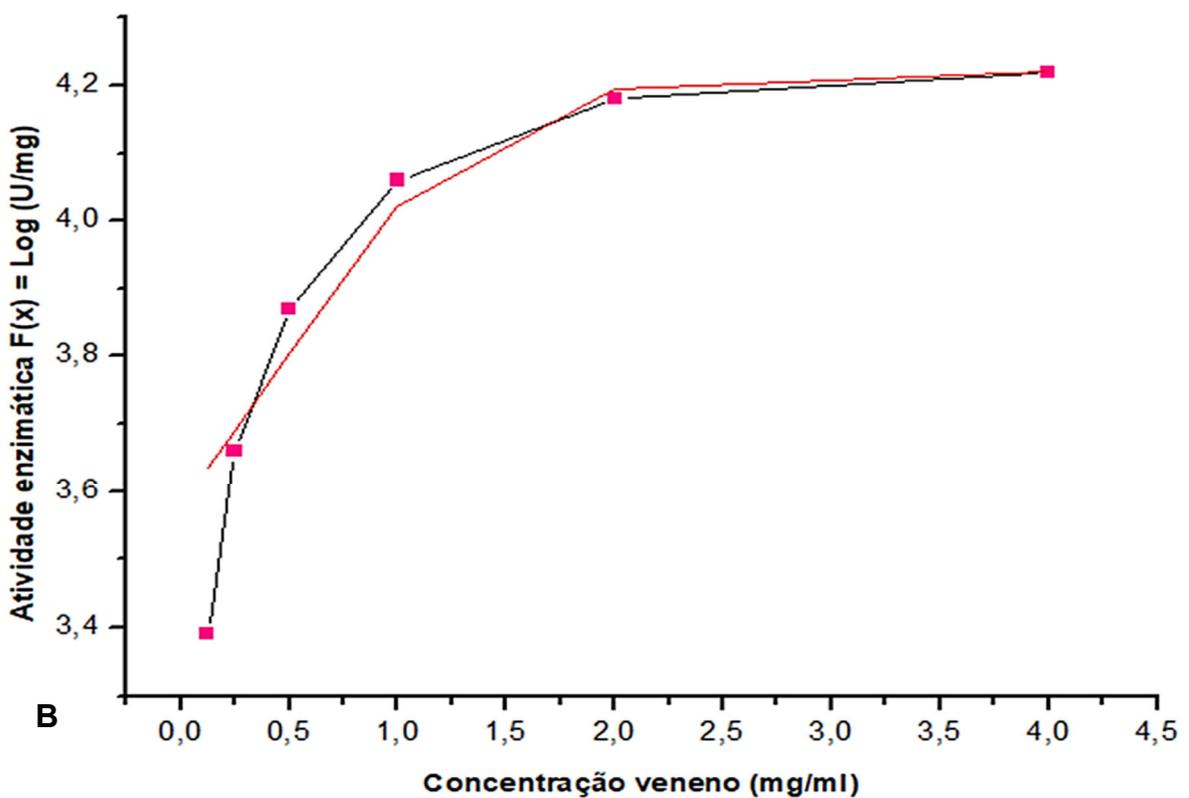
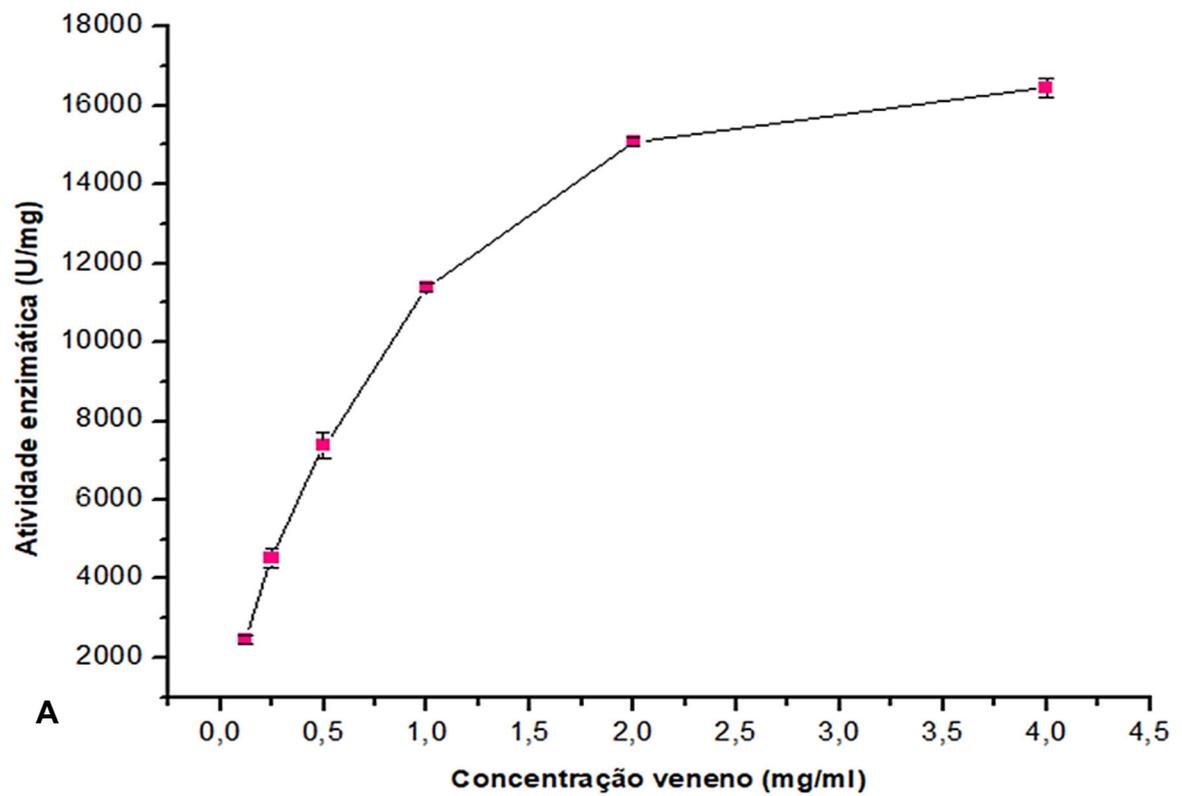


Figura 8. Atividade enzimática pelo ensaio de Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) para a padronização do veneno. (A) Representação da atividade enzimática em configuração normal. (B) Representação da atividade enzimática em configuração de função logarítmica acompanhada de uma curva dose-resposta (linha vermelha).

Os ensaios de mensuração da atividade catalítica das lipases, em geral, podem envolver métodos químicos ou físicos. O químico está relacionado com a dosagem da quantidade de perda de substrato ou de produto liberado após a hidrólise, enquanto que o físico se baseia em alterações nas propriedades físicas conforme o tempo, em exemplificação, a condutividade, tensão interfacial ou turbidez (ABOUSALHAM; VERGER, 2000). O ensaio de Marinetti (1965) é um método baseado na redução da turbidez da emulsão de gema de ovo pela lisolecitina conforme o tempo. É um ensaio considerado simples, rápido, barato pela exigência mínima de maquinário e substrato acessível abundante em lipoproteínas que representam o estado natural dos fosfolipídios em células *in vivo*. Entretanto, possui pouca sensibilidade e é semiquantitativo, fornecendo atividade enzimática relativa (REYNOLDS *et al.*, 1991). É importante elucidar que as emulsões de gema de ovo não serão uniformes e isso pode gerar diferentes velocidades de reação pela enzima, contudo, é uma eventualidade incontornável (MARINETTI, 1965).

O ensaio de hemólise indireta oferece maior especificidade à detecção de uma categoria de fosfolipase, a PLA₂, diferentemente do ensaio de clareamento de gema de ovo que detecta atividade geral de fosfolipase. Uma das atividades biológicas ocasionadas pela fosfolipase é a lise de eritrócitos, o qual o substrato é hidrolisado pela enzima e um dos produtos, os lisofosfolipídios, possuem ação de ruptura da membrana dos eritrócitos liberando hemoglobina. Dessa forma, é possível realizar uma dosagem da atividade fosfolipásica mediante a ação indireta da enzima (VOGEL *et al.*, 1981).

Tal como o ensaio de clareamento descrito por Marinetti (1965), o de hemólise indireta propõe uma análise semiquantitativa presente em uma amostra, contudo, caso haja uma purificação da enzima fosfolipase A₂ antes de testar a atividade, a dosagem será absoluta (VOGEL *et al.*, 1981). O presente trabalho tratou de utilizar veneno bruto para a mensuração da atividade fosfolipásica e padronização dos ensaios, uma vez que o objetivo geral está voltado para um perfil "screening" de laboratório, especificamente o Laboratório de Toxinologia do CEPB e não para fins de pesquisa refinada.

Alguns componentes do ensaio de hemólise indireta são importantes como o uso de uma solução de cloreto de cálcio para fornecer cofator para a ação enzimática da PLA₂, ao passo que no ensaio de Marinetti (1965) não é utilizado pois como já foi

relatado, detecta atividade fosfolipásica em geral e não uma categoria específica. Ademais, os eritrócitos utilizados no ensaio são provenientes de humano, diferentemente de alguns estudos que utilizaram de porquinho-da-índia (VOGEL *et al.*, 1981), cavalo (LEITE *et al.*, 2004) ou ovelha (GUTIÉRREZ *et al.*, 1988). Al-Abdulla, Sidki e Landon (1991) pontua que eritrócitos de diferentes espécies podem diferenciar entre si na capacidade de resistência à lise e isso pode ser um fator interferente nos resultados. A ordem crescente de resistência seria Porquinho-da-Índia < Humano < Coelho < Cavalo < Ovelha. Nesse caso, por questão de acessibilidade do laboratório, foi utilizado eritrócitos de humano assim como alguns estudos, apresentando como segundo lugar no patamar de susceptibilidade à lise.

A execução do ensaio de hemólise indireta pode ser em tubo ou em placa. De acordo com as observações obtidas da incubação da placa de agarose, a concentração de 1 mg/ml apresentou um halo de cerca de 2,2 cm de diâmetro, exibindo uma similaridade com a de 0,5 mg/ml por uma diferença de cerca de 1 mm (Figura 9). Por outro lado, as demais concentrações exibiram um diferencial de 2 mm de diâmetro. A placa realizada como um ensaio complementar demonstra simplicidade, baixo custo e um número abundante de amostras podem ser testadas simultaneamente. No preparo da placa, o gel de suporte deve ser cuidadosamente manuseado pois pode afetar o processo de difusão da enzima no substrato e resultar em dados inexatos (HABERMANN; HARDT, 1972).

O ensaio de placa poderia ser avaliado como "tudo ou nada" já que teria mais funcionalidade para detecção ou ausência da atividade fosfolipásica A_2 ao invés de fornecer uma informação quantitativa garantida. Gutiérrez *et al.* (1988) utilizou o ensaio de hemólise em placa para avaliar a qualidade dos antivenenos e, dessa forma, reduzindo o uso de camundongos em larga escala para testar a potência dos mesmos. Pode-se supor que este ensaio seria vantajoso para um perfil "screening" em pesquisas iniciais por exemplo na área de bioprospecção, e, ainda é uma das melhores opções em se tratando de amostras com tonalidade que venha interferir no resultado como alguns extratos vegetais.

Os demais ensaios de dosagem fosfolipásica compreendem processos de titulação, espectrofotometria, fluorometria e radiação. Araújo e Radvanyi (1987) executaram um experimento baseado na mudança de pH devido à liberação de ácidos graxos pela enzima PLA_2 de diferentes fontes. Alguns corantes indicadores de pH

foram testados e o vermelho de fenol foi um dos mais sensíveis. É considerado um ensaio simples, rápido e múltiplas amostras podem ser analisadas. Contudo, alguns pontos têm que ser avaliados como a probabilidade de uma alta inibição enzimática por alguns corantes ocasionando resultados qualitativamente corretos, mas quantitativamente errôneos. Ainda, não seria um ensaio específico para a detecção de PLA₂, pois outras enzimas que catalisam um fosfolípido e produz ácidos também seriam detectadas, a menos que uma purificação da enzima seja feita previamente.

Os ensaios fluorométricos utilizam substratos fosfolipídicos sintéticos marcados com um fluoróforo, sob o uso de reagentes acil-NBD³: NBD-PC (Fosfatidilcolina), NBD-PE (fosfatidiletanolamina), NBD-PG (fosfatidilglicerol) ou NBD-PA (ácido fosfatídico) (REYNOLDS *et al.*, 1991; STÁBELI *et al.*, 2012). Hendrickson e Rauk (1981) desenvolveram um ensaio para a PLA₂ utilizando um excimer emissor de lecitina marcado com pireno que atribui fluorescência de monômero quando hidrolisado.



Figura 9. Atividade enzimática pelo ensaio de hemólise indireta em placa. (CN) Controle Negativo; (1) 1 mg/ml; (2) 0,5 mg/ml; (3) 0,25 mg/ml; (4) 0,125 mg/ml; (5) 0,0625 mg/ml.

³ Norbornadieno (NBD) é um hidrocarboneto bicíclico ligante a metais cujos complexos são úteis para a catálise homogênea.

Grande parte das pesquisas utilizam os substratos sintéticos cromogênicos que se assemelham a um fosfolipídio a fim de evitar a problemática de especificidade enzimática. Holzer e Mackessy (1996) desenvolveram um ensaio em microplaca utilizando o substrato sintético ácido 4-nitro-3-octanoiloxibenzoico, o qual induzia a formação de um produto detectável à 425 nm. É um ensaio avaliado como rápido, barato, requerendo um mínimo de equipamento especializado e analisando um grande número de amostras. Utilizou-se Triton X-100 como um reagente de apoio para pausar a reação pois o teste com EDTA demonstrou ser danoso por provocar a extinção do cromóforo. No ensaio de hemólise indireta que foi executado neste trabalho, EDTA foi adicionado para pausar a reação enzimática produzindo um complexo enzima-Ca²⁺-EDTA indissociável e, dessa forma, obter mais estabilidade na leitura da absorbância.

Estabelecendo um viés comparativo dos ensaios relatados, alguns exigem equipamento especializado, monitoramento contínuo do pH, produtos comerciais caros e uma técnica bastante laboriosa. Os ensaios radioativos, por exemplo, fornecem resultados com grande grau de confiabilidade, embora demandem muita automação, além de ser um processo demorado. Para um modelo de laboratório simples como o de Toxinologia do CEPB, os ensaios laboratoriais devem se adequar conforme as condições do ambiente, avaliando os possíveis pontos inconvenientes.

Posteriormente à padronização do substrato e veneno, amostras de veneno de diferentes espécies foram testadas. O ensaio de Marinetti (1965) (Tabela 5) (Figura 10A) e o de Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) (Tabela 6) (Figura 10B) evidenciaram, respectivamente, maior atividade fosfolipásica geral e PLA₂ pelas espécies *B. jararacussu* e *C.d. collilineatus* em relação as outras. As concentrações de 0,5 e 1 mg/ml foram testadas simultaneamente não apresentando, em geral, uma diferença muito significativa na atividade enzimática, assim como foi observado no ensaio de padronização da concentração de veneno.

Tabela 5. Atividade enzimática pelo ensaio de Marinetti (1965) em amostras de veneno de diferentes espécies.

| Espécie | Concentração veneno (mg/ml) | |
|---------------------------|-----------------------------|----------------|
| | 0,5 | 1 |
| <i>B. alternatus</i> | 57,6 ± 2,23 | 66,4 ± 2,40 |
| <i>B. jararacussu</i> | 207,2 ± 12,13 | 228,93 ± 1,40 |
| <i>B. atrox</i> | 114,17 ± 3,09 | 202,13 ± 15,27 |
| <i>C.d. collilineatus</i> | 216,13 ± 6,99 | 192,13 ± 11,47 |

Tabela 6. Atividade enzimática pelo ensaio de Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) em amostras de veneno de diferentes espécies.

| Espécie | Concentração veneno (mg/ml) | |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------|
| | 0,5 | 1 |
| <i>B. alternatus</i> | 1.020 ± 197,99 | 1.480 ± 0 |
| <i>B. jararacussu</i> | 23.446,67 ± 620,11 | 27.780 ± 413,28 |
| <i>B. atrox</i> | 13.900 ± 314,32 | 15.180 ± 138,56 |
| <i>C.d. collilineatus</i> | 22.273,33 ± 599,11 | 22.260 ± 590,25 |

Para o ensaio de Marinetti (1965), a análise de variância constatou uma diferença significativa entre as espécies para as duas concentrações, com exceção de *B. jararacussu* e *C.d. collilineatus*. Dentre todas as espécies, *B. alternatus* exibiu uma diferença muito significativa em relação às demais com uma atividade fosfolipásica baixa. *B. atrox* na concentração de 0,5 mg/ml apresentou uma diferença significativa das outras espécies, entretanto, já na concentração de 1 mg/ml a atividade enzimática apontou similaridades com as espécies *B. jararacussu* e *C.d. collilineatus*. Nesse caso, houve um aumento significativo entre as concentrações de 0,5 e 1 mg/ml. Inferimos que há uma probabilidade de que haja uma variação própria do veneno e que, possivelmente, seria interessante uma padronização futura à parte para a espécie.

Todas as espécies no ensaio de Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) manifestaram uma diferenciação considerável entre si na concentração de 1 mg/ml. *B. jararacussu* e *C.d. collilineatus* destacaram novamente com maior atividade de PLA₂. *B. alternatus* obteve uma atividade de PLA₂ baixa, enquanto que *B. atrox* expressou uma atividade mais moderada.

As amostras de veneno das espécies de serpentes utilizadas no trabalho possuem uma ocorrência no Brasil. A espécie *B. moojeni* é amplamente distribuída em áreas do cerrado e causa muitos acidentes ofídicos na região centro-oeste (D'AMÉLIO *et al.*, 2021). *B. jararacussu* é uma espécie presente em vários estados brasileiros, recorrente em florestas tropicais, pântanos e margens de rios (AGUIAR *et al.*, 2020). A região amazônica abriga a espécie endêmica *B. atrox* que é responsável pela maioria dos casos de envenenamento na região (MONTEIRO *et al.*, 2020). Já a *B. alternatus* está presente no Mato Grosso do Sul e Goiás até a região central da Argentina e limite meridional do Uruguai (ROCHA; FURTADO, 2005). Outro grupo de serpentes de grande importância é *C. durissus* que é uma espécie neotropical encontrada na maior parte da América do Sul e suas subespécies (*C.d. terrificus*, *C.d.*

cascavella e *C.d. collilineatus*) diferem-se entre si por aspectos morfológicos e distribuição geográfica (SANTOS *et al.*, 2004; TASIMA *et al.*, 2020). A subespécie *C.d. collilineatus* possui uma distribuição geográfica compreendendo as regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2009).

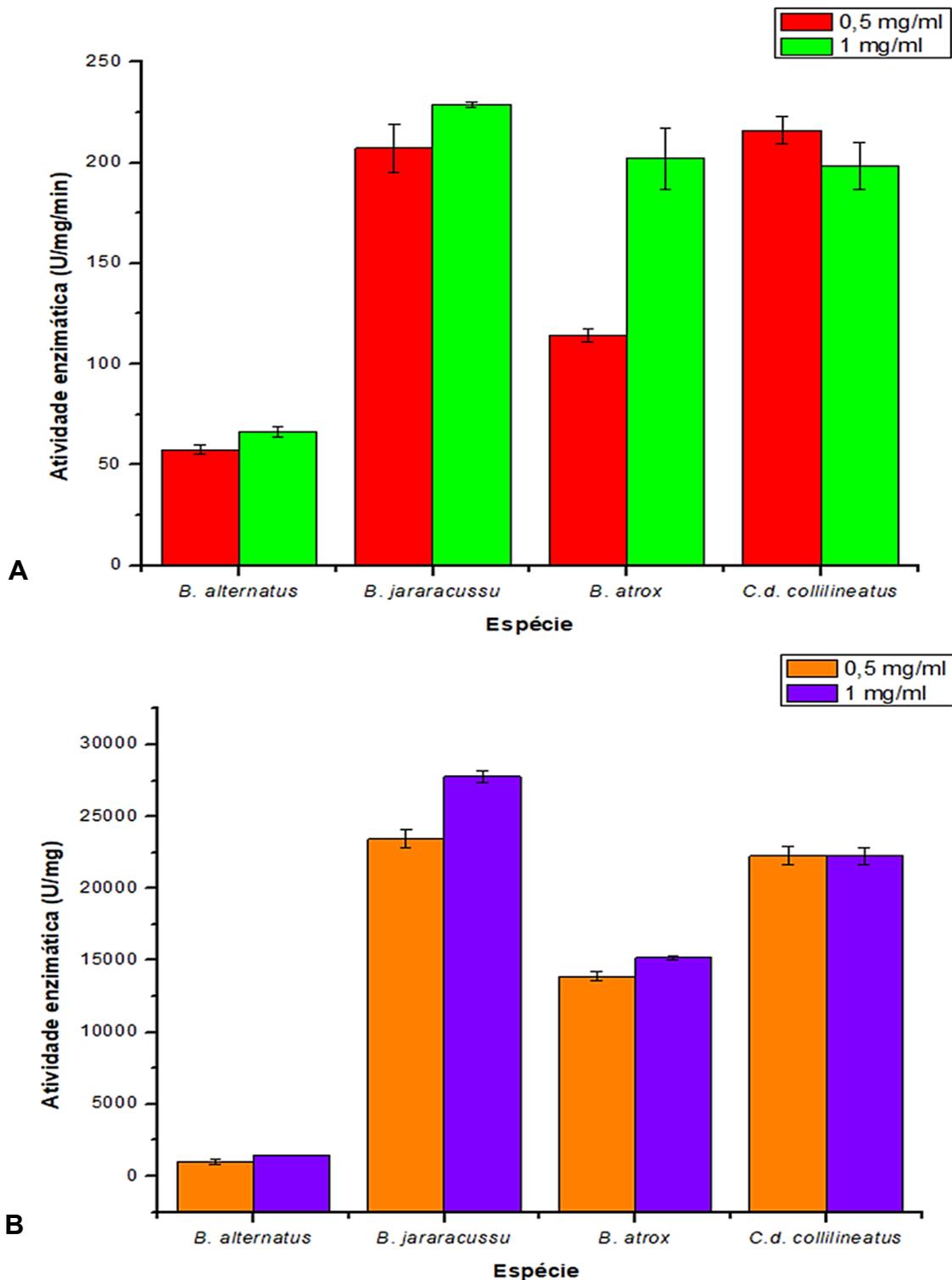


Figura 10. Atividade enzimática pelo ensaio de Marinetti (1965) (A) e Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) (B) em amostras de veneno de diferentes espécies.

O veneno do gênero *Bothrops* possui um efeito fisiopatológico mais relacionado à miotoxicidade resultando em dano no tecido muscular (LOMONTE *et al.*, 1990; ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000). Dentre os principais componentes desse veneno, destacam-se as PLA₂s e as metaloproteases (KASHIMA *et al.*, 2004). A espécie dominante na região centro-oeste *B. moojeni*, utilizada neste trabalho como veneno parâmetro para a padronização dos ensaios, expressa maior quantidade de metaloproteases, seguido por serinoproteases e fosfolipases (AMORIM *et al.*, 2017). Ainda, já foram relatados duas isoformas de PLA₂ miotóxica responsável pela grande toxicidade, MjTX-I e MjTX-II. Ambos são análogos da variante Lys49-PLA₂ e a variante MjTX-II apresentou um comportamento promissor nos estudos de atividade antimicrobiana, antitumoral e antiparasitário (STÁBELI *et al.*, 2006).

B. jararacussu apresenta duas classes predominantes de toxina: PLA₂s e metaloproteases (KASHIMA *et al.*, 2004; AGUIAR *et al.*, 2020). Expressam principalmente PLA₂s com uma potencialidade aproximada da espécie *C.d. terrificus* (MARUNAK *et al.*, 2007). A botrotoxina (BthTX-II) é uma PLA₂ miotóxica básica homóloga à Asp49-PLA₂ isolada da *B. jararacussu* e compreendendo grande percentual do veneno. HOMSI-BRANDEBURGO *et al.* (1988) fracionaram o veneno identificando pelo menos quatro PLA₂s, duas ácidas e uma neutra, que são consideradas menos tóxicas em comparação com as básicas.

A composição do veneno de *C. durissus* é basicamente por crotoxina, crotamina, giroxina e convulxina. A crotoxina é o principal componente tóxico e foi isolada pela primeira vez por Slotta e Fraenkel-Conrat (1938). É uma β-neurotoxina formada por uma associação sinérgica de uma subunidade básica (CB) que contém alta atividade de PLA₂, porém baixa toxicidade e uma subunidade ácida (CA) desprovida de atividade enzimática e toxicidade, denominada de crotapotina (SANTOS *et al.*, 2004; BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2016).

C. durissus apresenta isoformas com grande variabilidade entre as espécies e a presença destas isoformas de crotoxina é resultante das diferentes associações de suas subunidades (FAURE; POROWINSKA; SAUL, 2017). Faure e Bon (1987) isolaram e identificaram pelo menos 15 isoformas de crotoxina da espécie *C.d. terrificus* e que essa proporção pode ser variável de uma espécime para a outra considerando que pode haver diversos genes que codificam as diferentes isoformas. Beghini *et al.* (2000) estudaram a crotoxina da espécie *C.d. cascavella* isolando e

identificando 4 isoformas de CA e apenas uma de PLA₂ que poderia suceder combinações distintas.

No veneno de *B. atrox* há uma predominância de metaloproteases, seguida por PLA₂s e serino proteases (NEIVA *et al.*, 2009). As PLA₂s da espécie exercem atividade miotóxica em conjunto com outras enzimas (MONTEIRO *et al.*, 2020). Lomonte *et al.* (1990) isolaram uma miotoxina de *B. atrox* que parecia estar intimamente relacionada com a miotoxina I da *B. asper*, com uma atividade de PLA₂ e anticoagulante. Kanashiro *et al.* (2002) isolaram e caracterizaram duas PLA₂s, BaPLA₂I e BaPLA₂III, sendo a primeira um análogo da variante K-49/Lys-49 PLA₂ e a BaPLA₂III como D-49/Asp-49 PLA₂. Ambas possuíam alta atividade miotóxica, edematogênica e afins, contudo, isoladamente a variante BaPLA₂I exibiu baixa atividade de PLA₂, enquanto que a outra apresentou alta atividade enzimática.

Dentre as *Bothrops* testadas, a *B. alternatus* obteve baixa atividade fosfolipásica geral e de PLA₂. A análise transcriptômica da glândula de veneno realizada por Cardoso *et al.* (2010), revelou como principais grupos de transcritos de toxinas as metaloproteases, peptídeos potenciadores de bradicinina/peptídeos natriuréticos tipo C, fosfolipases A₂, serino proteases e lectinas do tipo C. As metaloproteases foram o grupo dominante com destaque para a classe PIII e as PLA₂ eram essencialmente ácidas. Dessa forma, a maior presença de PLA₂s ácidas atribui uma menor miotoxicidade para o veneno quando comparadas com outras espécies de *Bothrops*.

A presença da enzima PLA₂ em veneno de serpentes é demasiada em comparação com outras categorias de fosfolipase. A potência das atividades enzimáticas de cada espécie, especificamente a fosfolipase, diferem-se por fatores genéticos e ambientais o que torna a variabilidade inter e intraespecífica uma temática imensamente discutida em pesquisas científicas.

5. CONCLUSÃO

Os ensaios descritos por Marinetti (1965) e Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) foram padronizados para as condições do Laboratório de Toxinologia do CEPB da PUC Goiás. Embora sejam relatados na literatura como metodologias menos recomendadas por se tratar de uma análise semiquantitativa, enaltecemos a importância desses ensaios simples para testes preliminares chamados de "screening" em pesquisas científicas.

O ensaio de Marinetti (1965) possui uma abordagem mais geral de fosfolipase, distintivamente do ensaio de hemólise indireta descrito por Gutiérrez, Ownby e Odell (1984) que possui uma maior especificidade voltada para a PLA₂. Além disso, o de Marinetti é um ensaio de diminuição da turbidez pelo clareamento da gema de ovo e o de hemólise há uma quantificação de hemoglobina liberada pela ação indireta da enzima nos eritrócitos. Ambos são ensaios espectrofotométricos simples com produtos acessíveis e exigindo o mínimo de equipamento.

Conforme as observações obtidas da padronização do substrato para ambos os ensaios, inferimos as concentrações ideais de 2,5 mg/ml e 3,125 mg/ml para o de Marinetti (1965) e Gutiérrez, Ownby e Odell (1984), respectivamente. Concentrações maiores embora apresentassem uma reação, não havia um aumento muito considerável na velocidade de hidrólise da enzima, iniciando uma tendência constante, assim como é postulado no princípio de Michaelis-Menten.

A padronização do veneno bruto revelou uma concordância para os dois ensaios. O ponto de 0,5 mg/ml foi considerado interessante, pois 1 mg/ml dependendo da espécie não apresentava uma diferença extrema em relação à 0,5 mg/ml. O ensaio complementar de hemólise indireta em placa conforme Gutiérrez *et al.* (1988) apontou similaridades nos halos nessas duas concentrações.

Após a padronização dos ensaios, amostras de veneno de diferentes espécies com ocorrência no Brasil foram testadas. As espécies *B. jararacussu* e *C.d. collilineatus* obtiveram alta atividade fosfolipásica geral e específica para a PLA₂, apresentando similaridades na potência. Em contrapartida, a espécie *B. alternatus* exibiu um veneno menos ativo para esta atividade e *B. atrox* indicou uma atividade mais moderada.

Portanto, a padronização de ensaios para as atividades bioquímicas é fundamental no campo da biologia experimental com a finalidade de otimização de tempo, possíveis reduções de custo com reagentes e maquinário especializado. Para o Laboratório de Toxinologia do CEPB, as padronizações se mostraram viáveis e aplicáveis para os futuros pesquisadores que ainda não utilizaram esses ensaios espectrofotométricos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD EL-AZIZ, Tarek Mhamed; SOARES, Antonio G.; STOCKAND, James D. **Advances in venomics: Modern separation techniques and mass spectrometry**. Journal of Chromatography B, v. 1160, p. 122352, 2020.
- ABOUSALHAM, Abdelkarim; VERGER, Robert. **Egg yolk lipoproteins as substrates for lipases**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, v. 1485, n. 1, p. 56-62, 2000.
- AGUIAR *et al.* **Comparative compositional and functional analyses of *Bothrops moojeni* specimens reveal several individual variations**. PloS one, v. 14, n. 9, 2019.
- AGUIAR *et al.* **Ontogenetic study of *Bothrops jararacussu* venom composition reveals distinct profiles**. Toxicon, v. 186, p. 67-77, 2020.
- AL-ABDULLA, Ibrahim H.; SIDKI, Ahmad M.; LANDON, John. **An indirect haemolytic assay for assessing antivenoms**. Toxicon, v. 29, n. 8, p. 1043-1046, 1991.
- ALOULOOU *et al.* **Phospholipases: an overview**. Lipases and phospholipases, p. 69-105, 2018.
- AMAZONAS *et al.* **Evidence for snake venom plasticity in a long-term study with individual captive *Bothrops atrox***. Toxins, v. 11, n. 5, p. 294, 2019.
- AMORIM *et al.* **New findings from the first transcriptome of the *Bothrops moojeni* snake venom gland**. Toxicon, v. 140, p. 105-117, 2017.
- AMORIM *et al.* **Proteopeptidomic, functional and immunoreactivity characterization of *Bothrops moojeni* snake venom: Influence of snake gender on venom composition**. Toxins, v. 10, n. 5, p. 177, 2018.
- ANDRIÃO-ESCARSO *et al.* **Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu***. Biochimie, v. 82, n. 8, p. 755-763, 2000.
- ANTON, Marc. **Composition and structure of hen egg yolk**. In: Bioactive egg compounds. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 1-6, 2007.

- ARAÚJO *et al.* ***Crotalus durissus* venom: biological effects and relevant applications.** Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v. 10, n. 1, p. 9-21, 2016.
- ARAÚJO, Albetiza Lôbo de; RADVANYI, François. **Determination of phospholipase A₂ activity by a colorimetric assay using a pH indicator.** Toxicon, v. 25, n. 11, p. 1181-1188, 1987.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. **Phospholipase A₂—a structural review.** Toxicon, v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996.
- BEGHINI *et al.* **Enzymatic characterization of a novel phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (maracambóia) venom.** Journal of protein chemistry, v. 19, n. 7, p. 603-607, 2000.
- BERNARDE, Paulo Sérgio. **Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil.** São Paulo: Anolisbooks, 2014.
- BOLDRINI-FRANÇA *et al.* ***Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: Analysis of gene expression profile.** Biochimie, v. 91, n. 5, p. 586-595, 2009.
- BOSCH, H. Van Den; AARSMAN, A. J. **A review on methods of phospholipase A determination.** Agents and Actions, v. 9, n. 4, p. 382-389, 1979.
- BRAHMA *et al.* **Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes.** Toxicon, v. 93, p. 1-10, 2015.
- BUSTILLO *et al.* **Isolation of two basic phospholipases A₂ from *Bothrops diporus* snake venom: Comparative characterization and synergism between Asp49 and Lys49 variants.** Toxicon, v. 168, p. 113-121, 2019.
- CALVETE, Juan J.; JUÁREZ, Paula; SANZ, Libia. **Snake venomomics. Strategy and applications.** Journal of mass spectrometry, v. 42, n. 11, p. 1405-1414, 2007.
- CARDOSO *et al.* **A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu).** BMC genomics, v. 11, n. 1, p. 1-22, 2010.
- CASEWELL *et al.* **Causes and consequences of snake venom variation.** Trends in pharmacological sciences, v. 41, n. 8, p. 570-581, 2020.

- CEDRO *et al.* **Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A₂ from *Bothrops jararaca* snake venom.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, v. 24, 2018.
- CHIPPAUX, J.-P.; WILLIAMS, Vaughn; WHITE, Julian. **Snake venom variability: methods of study, results and interpretation.** Toxicon, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.
- COSTA, Henrique C.; GUEDES, Thaís B.; BÉRNILS, Renato Silveira. **Lista de répteis do Brasil: padrões e tendências.** In: Sociedade Brasileira de Herpetologia. Herpetologia Brasileira. V.10, n.3, 2021.
- D'AMÉLIO *et al.* ***Bothrops moojeni* venom and its components—an overview.** Journal of Venom Research, v. 11, p. 26, 2021.
- DOLE, Vincent P. **A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose.** The Journal of clinical investigation, v. 35, n. 2, p. 150-154, 1956.
- DOLEY, Robin; ZHOU, Xingding; KINI, R. Manjunatha. **Snake venom phospholipase A₂ enzymes.** In: MACKESSY, Stephen P. Handbook of venoms and toxins of reptiles. CRC Press, 2010.
- FAURE, G.; POROWINSKA, D.; SAUL, F. **Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* and crotoxin-related proteins: Structure and function relationship.** Gopalakrishnakone P, Cruz LLS, editor's. Toxins Drug Discov. Springer, p. 3-20, 2017.
- FAURE, Grazyna; BON, Cassian. **Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*.** Toxicon, v. 25, n. 2, p. 229-234, 1987.
- FERNANDES *et al.* **A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A₂-like proteins from viperid snake venoms.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, v. 1844, n. 12, p. 2265-2276, 2014.
- FRANCISCHETTI *et al.* **Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*).** Comparative

Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, v. 127, n. 1, p. 23-36, 2000.

GOSWAMI, Priyanka Kantivan; SAMANT, Mayuri; SRIVASTAVA, Rashmi S. **Snake venom, Anti-snake venom & Potential of snake venom**. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v. 6, n.5, 2014.

GUTIÉRREZ *et al.* **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, José María; OWNBY, Charlotte L.; ODELL, George V. **Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle**. Toxicon, v. 22, n. 1, p. 115-128, 1984.

HABERMANN, E.; HARDT, K. L. **A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases**. Analytical biochemistry, v. 50, n. 1, p. 163-173, 1972.

HENDRICKSON, H. Stewart; RAUK, Phillip N. **Continuous fluorometric assay of phospholipase A₂ with pyrene-labeled lecithin as a substrate**. Analytical Biochemistry, v. 116, n. 2, p. 553-558, 1981.

HOLZER, Matthew; MACKESSY, Stephen P. **An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂**. Toxicon, v. 34, n. 10, p. 1149-1155, 1996.

HOMSI-BRANDEBURGO *et al.* **Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin**. Toxicon, v. 26, n. 7, p. 615-627, 1988.

JIA *et al.* **Phospholipase A₂ in the venom of three cottonmouth snakes**. Toxicon, v. 135, p. 84-92, 2017.

KANASHIRO *et al.* **Biochemical and biological properties of phospholipases A₂ from *Bothrops atrox* snake venom**. Biochemical Pharmacology, v. 64, n. 7, p. 1179-1186, 2002.

KANG *et al.* **Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis**. The FEBS journal, v. 278, n. 23, p. 4544-4576, 2011.

- KASHIMA *et al.* **Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I—gene expression profile of highly expressed phospholipases A₂.** *Biochimie*, v. 86, n. 3, p. 211-219, 2004.
- KINI, R. Manjunatha. **Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes.** *Toxicon*, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.
- KINI, R. Manjunatha; EVANS, Herbert J. **A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂.** *Toxicon*, v. 27, n. 6, p. 613-635, 1989.
- KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. **Snake venom components and their applications in biomedicine.** *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, v. 63, n. 24, p. 3030-3041, 2006.
- KOHLER *et al.* **Phospholipase A₂ and phospholipase B activities in fungi.** *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*. v. 1761, n. 11, p. 1391-1399, 2006.
- LEITE *et al.* **Effects of a myotoxic Asp49 phospholipase A₂ (ACL-I PLA₂) isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom on water transport in the isolated toad urinary bladder.** *Toxicon*, v. 43, n. 7, p. 847-853, 2004.
- LOMONTE *et al.* **Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms.** *Toxicon*, v. 28, n. 10, p. 1137-1146, 1990.
- LOMONTE *et al.* **The phospholipase A₂ homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles.** *Protein and Peptide Letters*, v. 16, n. 8, p. 860-876, 2009.
- LOMONTE, Bruno; GUTIÉRREZ, José María. **Phospholipases A₂ From Viperidae Snake Venoms: How do They Induce Skeletal Muscle Damage?.** *Acta Chim. Slov.*, v.58, p.647–659, 2011.
- LOMONTE, Bruno; RANGEL, José. **Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors.** *Toxicon*, v.60, p.520–530, 2012.

- MARINETTI, G. V. **The action of phospholipase A on lipoproteins.** *Biochimica et biophysica acta (BBA)-lipids and lipid metabolism*, v. 98, n. 3, p. 554-565, 1965.
- MARUNAK *et al.* **Isolation and biological characterization of a basic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom.** *Biocell*, v. 31, n. 3, p. 355-364, 2007.
- MODAHL *et al.* **Omics technologies for profiling toxin diversity and evolution in snake venom: Impacts on the discovery of therapeutic and diagnostic agents.** *Annual review of animal biosciences*, v. 8, p. 91-116, 2019.
- MODAHL, Cassandra M.; DOLEY, Robin; KINI, R. Manjunatha. **Venom analysis of long-term captive Pakistan cobra (*Naja naja*) populations.** *Toxicon*, v. 55, n. 2-3, p. 612-618, 2010.
- MONTEIRO *et al.* ***Bothrops atrox*, the most important snake involved in human envenomings in the amazon: How venomomics contributes to the knowledge of snake biology and clinical toxinology.** *Toxicon: X*, v. 6, p. 100037, 2020.
- MORIKAWA *et al.* **Phospholipase A₁ assays using a radiolabeled substrate and mass spectrometry.** *Methods in enzymology*, v. 434, p. 1-13, 2007.
- NEIVA *et al.* **Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs).** *Toxicon*, v. 53, n. 4, p. 427-436, 2009.
- OBANDO *et al.* **Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A₂ myotoxins of viperid snake venom in vitro and in vivo.** *PLoS One*, v. 9, n. 10, p. e109846, 2014.
- OLIVEIRA *et al.* **Global proteomic and functional analysis of *Crotalus durissus collilineatus* individual venom variation and its impact on envenoming.** *Journal of proteomics*, v. 191, p. 153-165, 2018.
- PAULA *et al.* **Structural and pharmacological features of phospholipases A₂ from snake venoms.** *Protein and Peptide Letters*, v. 16, n. 8, p. 899-907, 2009.
- PEREIRA FILHO, Gentil Alves; VIEIRA, Washington Luiz da Silva; FRANÇA, Frederico Gustavo Rodrigues. **Serpentes de importância médica no Brasil.** In: DONATO *et al.* *Bioprospecção e Inovação Tecnológica de Produtos Naturais e Derivados de Plantas e Animais.* João Pessoa: Editora UFPB, p. 281-303, 2020.

- QUACH, Nhat D.; ARNOLD, Robert D.; CUMMINGS, Brian S. **Secretory phospholipase A₂ enzymes as pharmacological targets for treatment of disease**. *Biochemical pharmacology*, v. 90, n. 4, p. 338-348, 2014.
- REYNOLDS *et al.* **Assay strategies and methods for phospholipases**. *Methods in enzymology*, v. 197, p. 3-23, 1991.
- ROCHA, Marisa MT da; FURTADO, Maria de FD. **Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae)**. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 22, p. 383-393, 2005.
- SANTOS *et al.* **A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus***. *Toxicon*, v. 43, n. 7, p. 801-810, 2004.
- SLOTTA, Karl Heinrich; FRAENKEL-CONRAT, Heinz. **Two active proteins from rattlesnake venom**. *Nature*, v. 142, n. 3587, p. 213-213, 1938.
- SOARES *et al.* **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.
- SOARES, Andreimar M.; FONTES, Marcos RM; GIGLIO, José R. **Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship**. *Current Organic Chemistry*, v. 8, n. 17, p. 1677-1690, 2004.
- STÁBELI *et al.* ***Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 142, n. 3-4, p. 371-381, 2006.
- STÁBELI *et al.* **Purification of phospholipases A₂ from American snake venoms**. *Chromatography—the Most Versatile Method of Chemical Analysis*, p. 1-34, 2012.
- TASIMA *et al.* **Crotamine in *Crotalus durissus*: distribution according to subspecies and geographic origin, in captivity or nature**. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 26, 2020.

TEIXEIRA *et al.* **Insights into the antiviral activity of phospholipases A₂ (PLA₂s) from snake venoms.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 164, p. 616-625, 2020.

VOGEL *et al.* **Hemolytic assay for venom phospholipase A₂.** Analytical biochemistry, v. 118, n. 1, p. 262-268, 1981.

RESOLUÇÃO n°038/2020 – CEPE

ANEXO I APÊNDICE ao TCC

Termo de autorização de publicação de produção acadêmica

A estudante **Amanda Souza de Paula**, do Curso de **Ciências Biológicas – (Bacharelado)**, matrícula **20181005002402**, telefone: **(62)995354844**, e-mail **aspaula05@gmail.com**, na qualidade de titular dos direitos autorais, em consonância com a Lei n° 9.610/98 (Lei dos Direitos do autor), autoriza a Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás) a disponibilizar o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado **PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS PARA DOSAGEM DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA EM VENENOS DE SERPENTES**, gratuitamente, sem ressarcimento dos direitos autorais, por 5 (cinco) anos, conforme permissões do documento, em meio eletrônico, na rede mundial de computadores, no formato especificado (Texto (PDF); Imagem (GIF ou JPEG); Som (WAVE, MPEG, AIFF, SND); Vídeo (MPEG, MWV, AVI, QT); outros, específicos da área; para fins de leitura e/ou impressão pela internet, a título de divulgação da produção científica gerada nos cursos de graduação da PUC Goiás.

Goiânia, 29 de junho de 2022.



Assinatura do autor:

Nome completo do autor: Amanda Souza de Paula



Assinatura do professor-orientador:

Nome completo do professor-orientador: Matheus Godoy Pires