UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor recombinante de miotoxinas, do tipo-α, da serpente *Bothrops alternatus*

Tiago Sampaio de Sousa

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor recombinante de miotoxinas, do tipo-α, da serpente *Bothrops alternatus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Tiago Sampaio de Sousa
Orientadora: Profa. Dra. Suely Vilela

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 30/09/15. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sampaio de Sousa, Tiago

"**Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor recombinante de miotoxinas, do tipo-α, da serpente *Bothrops alternatus***". Ribeirão Preto, 2015.

150p. : il.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia

Orientadora: Suely Vilela

1. *Bothrops alternatus* 2. αBaltMIP 3. rBaltMIP

4. αPLI 5. Inibição de miotoxicidade

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: **Tiago Sampaio de Sousa**

Título do Trabalho: **Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor recombinante de miotoxinas, do tipo-α, da serpente *Bothrops alternatus*.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Suely Vilela

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Lodovico e Rosa, por serem exemplo de vida e determinação;
Aos meus irmãos, Rafael e Natália, pelo carinho e amizade;
Família que tanto amo e que estiveram comigo em todos os momentos.

Agradecimentos

A Deus, por sempre estar presente em minha vida.

À Profa. Dra. Suely Vilela, por ter aberto as portas do Laboratório de Toxinologia dando todo o suporte necessário para realização deste trabalho e pela valiosa orientação, contribuindo para minha formação acadêmica e profissional, muito obrigado.

Aos meus pais, Lodovico e Rosa, pela compreensão, amor e por todos os esforços dedicados à minha formação, permitindo que eu atingisse este objetivo.

Aos meus irmãos, Rafael e Natália, por me apoiarem e acreditarem no meu sucesso.

Ao Norival e à Adélia, por todo suporte, por terem compartilhando comigo suas experiências e pela grande contribuição técnica a esta pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Toxinologia, Franco, Luiz, Marco Aurélio, Tássia, Marina, Sante, Raphaela, Tatiane, Carolina, Danilo, Anna Laura e Regina, pela amizade e harmoniosa convivência.

Aos técnicos do Laboratório de Toxinologia, sempre dispostos a auxiliar, especialmente ao Luiz Fernando pela colaboração.

Aos técnicos do Biotério Central da USP-RP e do Biotério da FCFRP, pelo auxilio no cuidado dos animais que foram sujeitos desta pesquisa.

À minha avó, D. Terezinha, pelo amor e compaixão que sempre me mostrou.

Aos meus tios, Celso e Malú, e aos meus primos Vinícius e Stefânia, pelo apoio durante minha formação como farmacêutico.

À família Sampaio, especialmente as tias Julia e Cida, por estarem sempre presentes.

À família Sousa, por sempre proporcionarem situações agradáveis e boas risadas.

A Vinicius Warisaia, pelo companheirismo e apoio nos momentos bons e naqueles nem tão bons. Obrigado por estar presente!

Aos ex-companheiros da republica, Tiago e Daniel que, mesmo longe, sempre terão meu carinho e amizade e, aos atuais companheiros de república, Alan e Dieyson, pelos bons momentos.

Aos amigos de dentro e fora do ambiente de Faculdade, Daniel Leite, Ana Carolina, Daniel Costa, Jéssica, Tatiane, Clara, Lucas, Renan, Otávio, Rodrigo Zago, pela torcida, amizade e risadas.

Aos amigos João Gabriel, Fabiane e a João Pedro, que mesmo longe sempre estiveram em meus pensamentos.

Ao Laboratório de Química de Proteínas da FMRP-USP, na supervisão do Professor Dr. José Cesar Rosa, pela colaboração durante as análises em espectrometria de massas.

Ao Laboratório de Toxinas Animais da FCFRP-USP, sob supervisão da Professora Dra. Eliane Candiani Arantes, especialmente à Johara Boldrini França, pela grande contribuição na expressão do inibidor.

Ao Laboratório de Glicoimunologia da FCFRP-USP, sob supervisão do Professor Dr. Marcelo Dias Baruffi, especialmente à Thalita Riul pela grande contribuição nos experimentos de imunogenicidade.

Ao Professor Dr. Fábio de Oliveira, UFU, Uberlândia - MG, pela colaboração durante as análises histopatológicas.

A todos os professores, funcionários e pesquisadores, que direta ou indiretamente contribuíram nesta etapa da minha formação, como pesquisador.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento.

RESUMO

Sousa, T. S. **"Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor recombinante de miotoxinas, do tipo-α, da serpente *Bothrops alternatus.*"** 2015. 150f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Fosfolipases A_2 (PLA_2s) são enzimas abundantes em peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops,* possuindo uma grande variedade de efeitos farmacológicos e/ou tóxicos, como miotóxico, causador de necrose muscular. Em busca de novos fármacos de interesse médico e científico, os inibidores de fosfolipases A_2 (PLIs) tornaram-se importantes alvos de pesquisa nos últimos anos. Tendo isto em vista, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de fosfolipase A_2 miotóxica do tipo alfa (αBaltMIP) de *B. alternatus* em sua forma recombinante. Para os estudos de neutralização funcional foram utilizadas as toxinas da peçonha de *Bothrops jararacussu*: Lys49 PLA_2-símile BthTX-I e a Asp49 PLA_2 BthTX-II. O processo de purificação das toxinas de *B. jararacussu* consistiu em dois passos cromatográficos: exclusão molecular seguida de troca iônica, sendo o grau de pureza avaliado por HPLC. A expressão heteróloga do inibidor recombinante α-BaltMIP foi induzida em leveduras *Pichia pastoris*. O inibidor purificado, denominado rBaltMIP, apresentou-se como uma proteína pura com pI de 5,8, massa molecular de ~21 kDa por SDS-PAGE e 19,5 kDa por MALDI/TOF MS e com conteúdo de carboidratos de 10%. Após o sequenciamento dos peptídeos trípticos obtidos, os resultados foram comparados com outros αPLIs depositados em bancos de dados, observando-se 100% de identidade entre o rBaltMIP e o seu inibidor nativo αBaltMIP, e de 92 a 96% com os demais inibidores analisados. Para as toxinas BthTX-I e BthTX-II, as concentrações efetivas (CE50) para as atividades miotóxicas medidas através dos níveis plasmáticos de CK foram de 0,1256 µg/µL e de 0,6183 µg/µL, respectivamente, e quando incubadas com o rBaltMIP houve neutralização de até 65% da miotoxicidade induzida por estas enzimas. Já nos ensaios de formação de edema de pata, foram obtidas as CE50 de 0,02581 µg/µL e 0,02810 µg/µL, respectivamente, com neutralização do edema pelo rBaltMIP de até 40%, mostrando-se um inibidor viável para complementar a soroterapia antiofídica sem, no entanto, ser imunogênico. Reforçando esta hipótese, experimentos de neutralização da miotoxicidade feitos com a miotoxina BthTX-I mostraram que o rBaltMIP foi mais eficiente em inibir os danos musculares que o próprio soro antiofídico quando usado isoladamente. Assim, devido a gravidade dos envenenamentos e a baixa neutralização de seus efeitos locais, como a miotoxicidade, pelo soro antiofídico usado atualmente, o estudo do rBaltMIP como inibidor de PLA_2s do grupo II de serpentes torna-se promissor devido às suas possíveis aplicações clínicas, podendo neutralizar com maior rapidez, eficiência e especificidade as ações tóxicas de peçonhas ofídicas.

Palavras Chave: Miotoxinas, αPLI, *Bothrops alternatus*, rBaltMIP, inibição de miotoxicidade, αBaltMIP, inibidor de Fosfolipase A_2, caracterização bioquímica.

ABSTRACT

Sousa, T. S. **Biochemical and functional characterization of a recombinant alpha-type myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake.** 2015. 150f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Phospholipases A_2 are abundant enzymes present in *Bothrops* venoms which have a wide variety of pharmacological and/or toxic effects, such as myotoxicity, related to muscle necrosis. In search for new drugs of medical and scientific interest, the phospholipase A_2 inhibitors (PLIs) have become important targets in recent years. Considering this, the present study aimed at the biochemical and functional characterization of an alpha type phospholipase A_2 inhibitor (α-BaltMIP) from *B. alternatus* in its recombinant form. For the functional neutralization studies, toxins from *Bothrops jararacussu* venom were used: Lys49 PLA_2-like BthTX-I and Asp49 PLA_2 BthTX-II. The process of purification of *B. jararacussu* toxins consisted of two chromatographic steps: molecular exclusion followed by ion exchange, evaluating their purity by HPLC. The heterologous expression of the recombinant αBaltMIP inhibitor was induced in *Pichia pastoris* yeast. The purified inhibitor, called rBaltMIP, presented itself as a pure protein with pI of 5.8, molecular mass of ~21 kDa by SDS-PAGE and 19.5 kDa by MALDI/TOF MS, with 10% carbohydrate content. After tryptic peptides sequencing, the results were compared with other αPLIs deposited in databases, observing a 100% identity between rBaltMIP and its native inhibitor αBaltMIP, and from 92 to 96% identity with the other analyzed inhibitors. Toxins BthTX-I and BthTX-II showed effective concentrations (EC50) for myotoxic activities measured via plasma CK levels of 0.1256 µg/µL and 0.6183 µg/µL, respectively, and incubation with rBaltMIP indicated neutralization of up to 65% of myotoxicity. In paw edema formation assays, EC50 of 0.02581 µg/µL and 0.02810 µg/µL, respectively, were observed, with edema neutralizations of up to 40% by rBaltMIP, showing viability to complement antivenoms without, however, being immunogenic. Reinforcing this hypothesis, myotoxicity neutralization experiments performed with the myotoxin BthTX-I showed that rBaltMIP was more effective in inhibiting muscle damage than the actual antivenom by itself. Thus, considering the severity of envenomations and the low neutralization of their local effects, such as myotoxicity, by the antivenoms currently used, the study of rBaltMIP as a PLA_2 inhibitor becomes promising due to its possible clinical applications, neutralizing quickly and with more efficiency and specificity the toxic actions of venoms.

Keywords: Myotoxins, αPLI, *Bothrops alternatus*, rBaltMIP, myotoxin inhibitor, αBaltMIP, Phospholipase A_2 inhibitor, Biochemical characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Serpente *B. jararacussu* e sua distribuição no Brasil. (© BERNARDE, 2011; © FUNASA, 2001)

Figura 2. Purificação da Lys 49 BthTX-I e da PLA_2 Asp 49 BthTX-II da peçonha de *B. jararacussu (A e B)*

Figura 3. Avaliação do grau de pureza da BthTX-I (A) e BthTX-II (B)

Figura 4. Avaliação da indução da expressão e pureza do inibidor recombinante após HPLC. (A, B e C)

Figura 5. Massa molecular relativa do inibidor expresso. *(A e B)*

Figura 6. Determinação da Massa Molecular do rBaltMIP por espectrometria de massas.

Figura 7. Gel de eletroforese SDS-PAGE do inibidor recombinante glicosilado e deglicosilado.

Figura 8. Determinação da Massa Molecular por espectrometria de massas do rBaltMIP deglicosilado.

Figura 9. Massa molecular do oligômero.

Figura 10. Determinação do ponto isoelétrico (pI). (A) Determinação da curva de gradiente.

Figura 11. Alinhamento entre as sequências deduzidas de peptídeos do rBaltMIP com a sequência de αBaltMIP nativo de *B.alternatus*.

Figura 12. Alinhamento múltiplo entre as sequências de resíduos de aminoácidos do rBaltMIP e outras sequências de αPLIs.

Figura 13. Avaliação da atividade fosfolipásica das bothropstoxinas e da peçonha.

Figura 14. Avaliação da atividade miotóxica.

Figura 15(A). Determinação da miotoxicidade (CE50) da BthTX-I.

Figura 15(B). Determinação da miotoxicidade (CE50) da BthTX-II.

Figura 16(A). Determinação da CE50 edematogênica para BthTX-I.

Figura 16(B). Determinação da CE50 edematogênica para BthTX-II.

Figuras 17. Inibição da atividade miotóxica da BthTX-I (A) e BthTX-II (B) pelo rBaltMIP.

Figura 18. Inibição da atividade edematogênica da BthTX-I (A) e BthTX-II (B) pelo rBaltMIP.

Figura 19. Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP em soros.

Figura 20. Especificidade rBaltMIP para a toxina BthTX-I.

Figuras 22. SDS-PAGE 12% com perfis eletroforéticos da BthTX-I e rBaltMIP (A) e Revelação das membranas de *Western blotting* (B) e (C).

Figura 22. Produção de anticorpos anti-rBaltMIP em soros de camundongos em tratamento com rBaltMIP.

Figura 23. Neutralização da atividade miotóxica da miotoxina Lys49 PLA_2-símile BthTX-I e da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* com incubação de 30 minutos.

Figura 24. Neutralização da atividade miotóxica da miotoxina Lys49 PLA_2-símile BthTX-I e da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* sem incubação.

Figura 25. Avaliação da potencial complementação da soroterapia convencional com rBaltMIP pela análise histopatológica.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Acidente bothrópico: Classificação quanto à gravidade e soroterapia recomendada segundo Pinho e Pereira (2001).

Tabelas 2A e 2B. Esquemas de avaliação da neutralização da atividade miotóxica do soro antiofídico comercial complementado ou não com o rBaltMIP.

Tabela 3. Sequências dos peptídeos trípticos.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMBIC – bicarbonato de amônio, NH_4HCO_3

Bis-acrilamida - N',N' – metileno bis-acrilamida

BPB – brometo de *p*-bromofenacila

BSA – albumina de soro bovino

BthA-I-PLA_2 - fosfolipase A_2 ácida isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*

BthTX-I ou Lys49 BthTX-I ou PLA_2K49 BthTX-I – Botropstoxina I, fosfolipase A_2 básica, isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*

BthTX-II ou PLA_2Asp49 BthTX-II ou PLA_2D49 BthTX-II – Botropstoxina II, fosfolipase A_2 básica, isolada da peçonha da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*

CB – componente básico da crotoxina, fosfolipase A_2 isolada da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*

CE50 ou CE50% - Concentração efetiva 50%

CK – creatina cinase

DC – dicroísmo circular

DMSO – dimetil-sulfóxido

D-rBaltMIP - rBaltMIP deglicosilado

DTT – ditiotreitol

EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético

G-rBaltMIP – rBaltMIP glicosilado

Mr – massa molecular relativa

MTT – brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

PB – peçonha bruta

PBS – salina tamponada em fosfato

PCR – reação em cadeia de polimerase

PLA_2s - fosfolipases A_2

Lys49 PLA_2 homóloga, "*PLA_2-like*" *protein*, Lys49 PLA_2-símile, Lys49 miotóxica = PLA_2 sem atividade catalítica

Asp49 PLA_2 - PLA_2 com atividade catalítica (fosfolipásica)

PLIs – Inibidores de fosfolipases A_2

αBaltMIP – inibidor de PLA_2 do tipo alfa purificado do soro de *B. alternatus*

rBaltMIP- inibidor recombinante ou heterólogo do αBaltMIP expresso em *P.pastoris*.

PrTX-I - Piratoxina I, fosfolipase A_2 básica, isolada da peçonha da serpente *Bothrops pirajai*

PrTX-III - Piratoxina III, fosfolipase A_2 básica, isolada da peçonha da serpente *Bothrops pirajai*

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

SA - Soro antiofídico veterinário comercial

SBF – soro bovino fetal

SD – "*Standard Deviation*" - Desvio padrão

SDS – dodecil sulfato de sódio

TEMED - N',N',N',N' – tetrametiletilenodiamina

TFA – ácido trifluoracético

Sumário

RESUMO viii
ABSTRACT ix
LISTA DE FIGURAS x
LISTA DE TABELAS xii
LISTA DE ABREVIATURAS xiii
1. INTRODUÇÃO 20
1.1. Serpentes 20
1.1.1. Serpente *Bothrops jararacussu* 21
1.2. Peçonhas de serpentes 26
1.2.1. Fosfolipases A_2 (PLA_2) 27
1.2.2. Miotoxinas 29
1.3. Inibidores de ações tóxicas de peçonhas de serpentes 34
1.3.1. Inibidores naturais presentes nas serpentes contra ações tóxicas de suas próprias peçonhas 36
1.3.1.1. Inibidores de PLA_2 - PLI 37
1.3.1.2. αBaltMIP – um Inibidor de PLA_2 39
1.3.1.3. rBaltMIP – Um inibidor recombinante 40
1.4. O acidente ofídico 41
1.4.1. Tratamento do acidente ofídico 43
1.4.1.1. Soroterapia 44
1.4.1.2. Complementação da soroterapia 45
2. OBJETIVOS 48
2.1. Geral 48
2.2. Específico 48
3. MATERIAIS E MÉTODOS 50
3.1. Materiais 50
3.1.1. Peçonhas 50
3.1.2. Animais 50
3.1.3. Soro antiofídico 50
3.1.4. Demais materiais 51
3.2. Métodos 51
3.2.1. Isolamento das Miotoxinas 51
3.2.1.1. Cromatografia de exclusão molecular da peçonha de *Bothrops jararacussu* 51
3.2.1.2. Cromatografia de troca iônica 51
3.2.2. Determinação quantitativa de proteínas 52

3.2.3. Avaliação do grau de pureza 52
3.2.3.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 52
3.2.3.2. Cromatografia de fase reversa em HPLC 53
3.2.4. Indução da expressão e purificação do inibidor recombinante 54
3.2.5. Caracterização Bioquímica do rBaltMIP 55
3.2.5.1. Determinação da massa molecular 55
3.2.5.1.1. Determinação da massa molecular de rBaltMIP em solução 55
3.2.5.1.2. SDS-PAGE a 13,5% 56
3.2.5.1.3. MALDI/TOF/TOF MS 56
3.2.5.2. Determinação do conteúdo de carboidratos do rBaltMIP 57
3.2.5.2.1. Deglicosilação do rBaltMIP (D-rBaltMIP) 57
3.2.5.2.2. Determinação da massa molecular relativa do rBaltMIP Deglicosilado (D-rBaltMIP) por SDS-PAGE 57
3.2.5.2.3. Determinação da massa molecular do rBaltMIP Deglicosilado (D-rBaltMIP) por MALD/TOF/TOF MS 57
3.2.5.3. Determinação do Ponto Isoelétrico do inibidor recombinante rBaltMIP 58
3.2.6. Caracterização Estrutural do rBaltMIP 59
3.2.6.1. Dedução das sequências dos peptídeos trípticos 59
3.2.6.1.1. Hidrólise tripsínica *in situ* 59
3.2.6.1.2. ESI Q-TOF 59
3.2.6.1.3. Identificação dos peptídeos obtidos utilizando o software MASCOT 60
3.2.6.1.4. Análise *in silico* e do grau de homologia do inibidor 60
3.2.7. Caracterização Funcional das toxinas BthTX-I e BthTX-II 60
3.2.7.1. Atividade Fosfolipásica 60
3.2.7.2. Atividade Miotóxica 61
3.2.7.2.1. Determinação das CE50 da BthTX-I e BthTX-II para miotoxicidade 62
3.2.7.3. Atividade edematogênica 62
3.2.7.3.1. Determinação das CE50 da BthTX-I e BthTX-II para edema 63
3.2.8. Caracterização Funcional do rBaltMIP 63
3.2.8.1. Neutralização da atividade miotóxica das toxinas BthTX-I e BthTX-II pelo inibidor rBaltMIP 63
3.2.8.2. Neutralização da atividade edematogênica das toxinas BthTX-I e BthTX-II pelo inibidor rBaltMIP 64
3.2.9. Caracterização do potencial imunogênico do rBaltMIP 65
3.2.9.1. Imunização de animais e obtenção de anticorpos policlonais anti-rBaltMIP em soro. 65

3.2.9.2. Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP em soros de camundongos imunizados por ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) 65

3.2.9.3. Avaliação da especificidade do rBaltMIP com a BthTX-I 67

3.2.9.4. Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP em soros de camundongos imunizados por *Western Blotting*..... 67

3.2.9.5. Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP em soros de camundongos em experimento de miotoxicidade. 68

3.2.10. Ensaios de miotoxicidade da peçonha de *B. jararacussu* e da toxina BthTX-I com soro antiofídico e rBaltMIP 69

3.2.10.1. Neutralização da miotoxicidade pelo soro antiofídico e rBaltMIP com incubação prévia de 30 min. 69

3.2.10.2. Neutralização da miotoxicidade pelo soro antiofídico e rBaltMIP sem incubação prévia de 30 min. 71

3.2.10.3. Análise histopatológica das fibras musculares 73

3.3. Análise dos resultados 73

4. RESULTADOS 75

4.1. Obtenção das toxinas BthTX-I e BthTX-II da peçonha de B. jararacussu 75

4.1.1. Cromatografia de exclusão molecular da peçonha de *B. jararacussu* 75

4.1.2. Cromatografia de troca catiônica da fração P4 da peçonha de *B. jararacussu* 75

4.1.3. Avaliação do grau de pureza das toxinas 77

4.2. Indução da expressão e purificação do inibidor recombinante rBaltMIP 78

4.2.1. Avaliação do grau de pureza do rBaltMIP 78

4.3. Caracterização Bioquímica do rBaltMIP 80

4.3.1. Determinação da Massa Molecular 80

4.3.1.1. Por SDS-PAGE 80

4.3.1.2. Por MALD/TOF/TOF MS 81

4.3.2. Conteúdo de carboidratos do rBaltMIP após Deglicosilação com PNGase F (D-rBaltMIP) 81

4.3.2.1. Determinação da massa molecular relativa do rBaltMIP Deglicosilado (D-rBaltMIP) por SDS-PAGE 81

4.3.2.2. Determinação da massa molecular do rBaltMIP Deglicosilado (D-rBaltMIP) por MALD/TOF/TOF MS 82

4.3.3. Determinação da Massa Molecular do rBaltMIP em solução 83

4.3.4. Determinação do Ponto isoelétrico do rBaltMIP. 84

4.4. Caracterização Estrutural do rBaltMIP 86

4.4.1. Obtenção dos Peptídeos trípticos do rBaltMIP 86

4.4.2. Grau de homologia do inibidor com inibidores descritos na literatura 87

4.5. Caracterização Funcional das toxinas BthTX-I e BthTX-II 89

4.5.1. Atividade Fosfolipásica 89
4.5.2. Atividade miotóxica 90
4.5.2.1. Determinação da CE50 da BthTX-I 91
4.5.2.2. Determinação da CE50 da BthTX-II 92
4.5.2. Atividade edematogênica 92
4.5.2.1. Determinação da CE50 da BthTX-I 92
4.5.3.2. Determinação da CE50 da BthTX-II 93
4.6. Caracterização Funcional do rBatMIP 94
4.6.1. Inibição da atividade miotóxica da BthTX-I e BthTX-II por rBaltMIP 94
4.6.3. Inibição da atividade edematogênica das toxinas BthTX-I e II pelo inibidor rBaltMIP 96
4.7. Avaliação do potencial imunogênico do rBaltMIP 98
4.7.1. Imunização de animais e obtenção de anticorpos policlonais anti-rBaltMIP em soro. 98
4.7.2. Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP em soros de camundongos imunizados por ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) 98
4.7.3. Avaliação da especificidade do rBaltMIP pela BthTX-I 99
4.7.4. Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP, em soros de camundongos imunizados, por *Western Blotting* 100
4.7.5. Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP, em soros de camundongos, em experimento de miotoxicidade. 103
4.8. Neutralização da miotoxicidade da toxina BthTX-I pelo soro antiofídico e rBaltMIP: determinação dos níveis de creatina cinase (CK) e análise histopatológica das fibras musculares 104
4.8.1. Neutralização da miotoxicidade da BthTX-I pelo soro antiofídico e rBaltMIP . 105
4.8.2. Análise histopatológica da neutralização da miotoxicidade da BthTX-I pelo soro antiofídico e rBaltMIP 107
5. DISCUSSÃO 110
6. CONCLUSÃO 131
8. ANEXO 1 - Certificado de Aprovação de ética no Uso de Animais – CEUA. 153

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Serpentes

De acordo com a *The Reptile Database*, existem no mundo aproximadamente 3.496 espécies de serpentes, das quais se estimam que 600 sejam peçonhentas (UETZ, 2014). No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia – SBH (2011), há 366 espécies de serpentes catalogadas possuindo uma das mais ricas faunas do planeta, das quais cerca de 15% são peçonhentas pertencentes às famílias *Elapidae* e *Viperidae* (BERNARDE, 2011).

Seguindo a classificação antiga, as serpentes peçonhentas presentes no território brasileiro pertencem a duas famílias: *Viperidae* (responsáveis pelos acidentes botrópico, crotálico e laquético) e *Elapidae* (responsáveis pelos acidentes elapídicos), sendo divididas em quatro gêneros: *Bothrops* (jararaca, jararacussu, urutu, caiçaca), *Crotalus* (cascavel), *Lachesis* (surucucu, surucutinga, pico-de-jaca) e *Micrurus* (coral-verdadeira) (BOFF, 2005).

Bernarde (2011) apresenta em seu trabalho uma lista com a nova classificação zoológica e nomenclatura das serpentes com o intuito de permitir a melhor identificação das espécies de importância médica e também o apropriado tratamento dos pacientes acometidos. Assim sendo, teria o intuito de facilitar a identificação das relações de parentesco entre as espécies e a variação dos constituintes tóxicos de suas peçonhas permitiria identificar de forma mais adequada os gêneros de serpentes responsáveis pelos acidentes botrópicos (*Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Bothrops* e *Rhinocerophis*), crotálico (*Caudisona*), laquético (*Lachesis*) e elapídico (*Leptomicrurus* e *Micrurus*).

As espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, cujos acidentes são denominados botrópicos, estão atualmente distribuídas em cinco gêneros (FENWICK, 2009; BERNARDE, 2011): *Bothriopsis* (2 espécies), *Bothrocophias* (1 espécie), *Bothropoides* (11 espécies), *Bothrops* (8 espécies) e *Rhinocerophis* (4 espécies) e encontram-se distribuídas em uma vasta área no território sendo encontradas espécies desde o nordeste e mata atlântica até no sul do país. Com a nova classificação quatro espécies características das regiões centro-oeste (MS, GO e DF), sudeste e sul do Brasil, anteriormente pertencentes ao gênero *Bothrops,* estão agora no gênero *Rhinocerophis* (MELGAREJO, 2003; SAWAYA, 2008).

Dentre elas, a urutu cruzeiro (*R. alternatus*) é a espécie de maior importância clínica possuindo uma grande produção de peçonha e uma ampla distribuição geográfica no território (sul de GO, MG, MS, MG, SP, PR, SC e RS) (MALGAREJO, 2003). Embora esta espécie tenha mudado de classificação de *Bothrops alternatus* para *Rhinocerophis alternatus,* esta nova nomenclatura taxonômica e sua classificação ainda é pouco utilizada e enfrenta controvérsias entre os profissionais da área médica (COSTA & BÉRNILS, 2012). No presente trabalho foi utilizada a nomenclatura antiga, sendo *Bothrops jararacussu* (LACERDA, 1884) e *Bothrops alternatus* (DUMÉRIL & BIBRON, 1854).

1.1.1. Serpente *Bothrops jararacussu*

Como outras serpentes da família *Viperidae*, as Jararacussus possuem como características a presença de dentição do tipo solenóglifa e fosseta loreal (corresponde a um orifício entre o olho e a narina), apresentam pupila do olho vertical, escamas carenadas e escamas pequenas no dorso da cabeça (MELGAREJO, 2003) **(Fig. 1).**

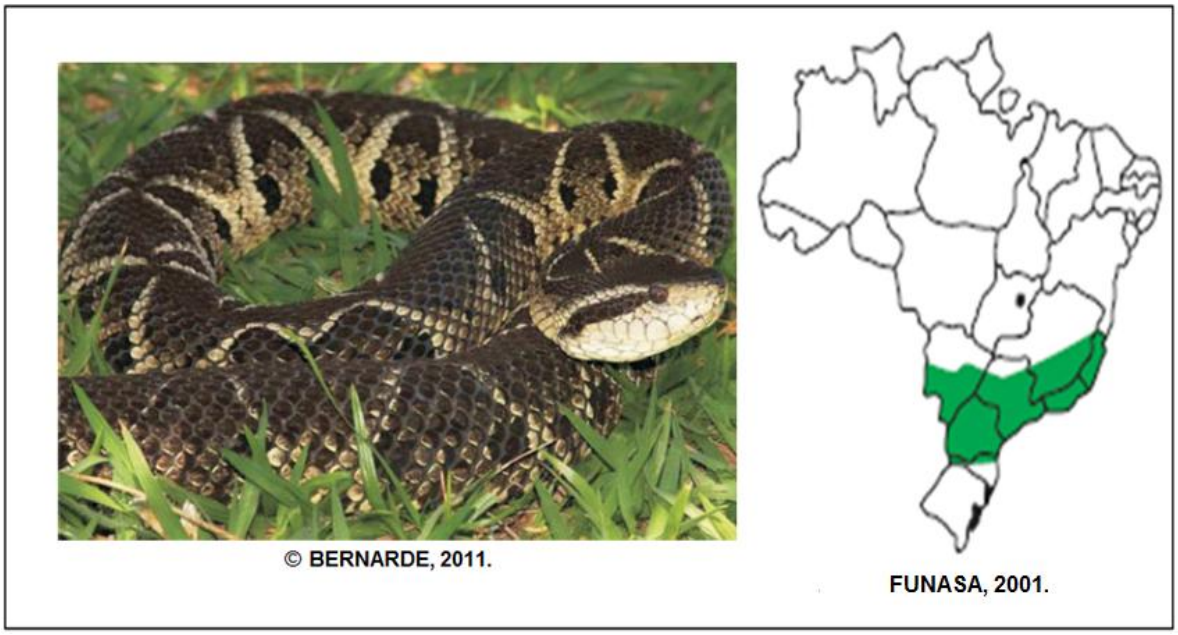


Figura 1. Serpente *B. jararacussu* e sua distribuição no Brasil.

Esta é a segunda maior serpente peçonhenta do Brasil em tamanho (podendo atingir mais de 2 metros) e que possui a maior capacidade de produção e inoculação de veneno. Está distribuída desde o sul da Bahia até o noroeste do Rio

Grande do Sul **(Fig.1)** e são comumente encontradas associadas aos córregos em mata de encosta (HARTMANN et al., 2003; MALGAREJO, 2003; BERNARDE, 2011). A coloração dorsal é variável entre cinza, amarelo, marrom ou preto, com manchas triangulares marrom-escuras, sua cabeça é desproporcionalmente grande, principalmente devido as suas extensas glândulas de veneno e por apresentar um aparelho inoculador bastante desenvolvido especializado em inocular o veneno em suas presas por serem semelhantes a agulhas de injeção e podem medir até 2,5 cm (CORREA-NETTO et al., 2007). Em sua dissertação, Correa-Netto (2007) relata que a quantidade de peçonha extraída de *B. jararacussu* pode ser 25 vezes maior que a quantidade extraída de uma serpente da espécie *B. alternatus,* citando Melgarejo (2003), que conseguiu obter 6,8 mL de peçonha (aproximadamente 1,67 mg após liofilização), em uma extração feita no Instituto Vital Brasil.

Outro ponto interessante está relacionado à dieta desta espécie, sendo esta bastante heterogênea compreendendo desde pequenos mamíferos até anfíbios, lagartos, marsupiais, dentre outros animais. Este fato parece estar muito mais relacionado a mudanças sazonais, ou disponibilidade de alimento em uma determinada região, podendo haver variações ontogenéticas na dieta com variações restritas a apenas uma fase da vida do animal (HARTMANN et al., 2003).

Os estudos com a peçonha de *B.jararacussu* começaram na década de 80. Rodrigues-Simioni et al. (1983) purificaram 10 frações da peçonha desta peçonha por Sephadex G-50, possuindo as frações de I-IV atividade fosfolipásica, e também investigaram os efeitos da peçonha bruta e de uma de suas frações na junção neuro muscular de sapos. Em seguida também trabalhando com a peçonha bruta, Queiroz et al. (1984), estudaram a necrose muscular causada e a posterior regeneração do tecido *in vivo*.

Em 1988, Homsi-Brandeburgo e colaboradores desenvolveram uma técnica de purificação desta peçonha utilizando cromatografia em Sephadex G-75 e SP-Sephadex C-25-120 e a partir de então, começaram a ser realizados novos testes e purificação de suas toxinas. Tanto a peçonha bruta quanto as frações obtidas das cromatografias (4 frações denominadas: $S_{I;}$ $S_{II;}$ S_{III} e S_{IV}), foram investigadas por Homsi-Brandeburgo et al. (1988) quanto às atividades como: coagulação do fibrinogênio *in vitro*; atividade fosfolipásica; atividade proteolítica; Dose Letal 50 (LD50) e pela primeira vez foram feitos ensaios de atividade miotóxica com componentes desta peçonha em músculos de animais seguindo o protocolo previamente publicado por Queiroz et al. (1984).

A primeira miotoxina com atividade fosfolipásica de uma serpente do gênero *Bothrops* foi isolada de *B. asper* por Gutiérrez et al. (1984), com massa molecular estimada por gel filtração em Sephadex G-75 de 10.700 Da, tendo sido também avaliadas além da atividade miotóxica, a atividade hemolítica indireta e efeitos hemorrágicos desta miotoxina. Em seu trabalho, Homsi-Brandeburgo et al. (1988) também encontrou miotoxinas na peçonha de *B. jararacussu*. Inicialmente foi utilizado tampão formiato de amônia 0,05 M, em pH 3,5 em uma coluna Sephadex G-75 conseguindo a separação de 4 frações denominadas: $S_{I;}$ $S_{II;}$ S_{III} e S_{IV}. Foram observadas nas frações S_I e S_{II} atividades coagulantes e fibrinogenolíticas assim como atividade proteolítica sobre a caseína. Na fração S_{III} foi observado atividades miotóxicas e fosfolipásicas, e a fração S_{IV} presentou peptideos potencializadores de bradicinina. Na fração S_{III} representando cerca de 37% de proteínas da peçonha bruta, além de observadas as atividades miotóxicas e fosfolipásicas, as proteínas mostraram-se termoestáveis mesmo com aquecimento em 100^0C por 3 minutos em pH 3,5. Desta forma, esta fração passou posteriormente por cromatografia de troca iônica SP-Sephadex C-25, utilizando como fase móvel concentração crescente de tampão acetato de amônio 0,1 M até 1,8 M em pH 5,0, da qual foram obtidas 5 outras frações (S_{III}-SP_I até S_{III}-SP_V). As duas primeiras frações foram identificadas como fosfolipases A_2 ácidas, sendo a S_{III}-SP_I com 22.000 Da e a S_{III}-SP_{II} com 15.500 Da em SDS-PAGE; a S_{III}-SP_{III} mostrou ser uma proteína neutra com baixa atividade fosfolipásica e com 28.840 Da. Já as S_{III}-SP_{IV} e S_{III}-SP_V mostraram-se proteínas básicas, possuindo pI 7,7 e 8,2, e massas relativas de 13.180 e 12.880 Da em SDS-PAGE, respectivamente. Essas duas frações apresentaram atividade miotóxica. Em seu trabalho, Homsi-Brandeburgo et al. (1988) designaram a fração S_{III}-SP_V de BthTX e fizeram algumas caracterizações, onde observaram que, embora as frações neutras da peçonha tivessem atividade miotóxica, elas diferiam das outras toxinas isoladas de outras serpentes do gênero *Bothrops* que eram extremamente hemorrágicas, como das serpentes *B.alternatus, B. atrox, B. codera, B. erythromelas* e *B. jararaca* que possuem baixos níveis de atividade miotóxica. Por outro lado, serpentes como *B. jararacussu, B. moogeni, B. neuwiedi* e *B. pradoi* possuem peçonhas altamente miotóxicas (MOURA-DA-SILVA, 1990).

Além das fosfolipases A_2 e miotoxinas encontram-se em maior proporção na peçonha de *B. jararacussu,* metaloproteases e serinoproteases. Com relação às serinoproteases, em 1996, Zaganelli e colaboradores, purificaram e caracterizaram uma glicoproteina da peçonha de *B. jararacussu* denominada de FC-Bj com

atividade na coagulação, mostrando em SDS-PAGE duas bandas com 50,6 e 60 kDa e faixa de pI entre 3,3-4,4. Esta glicoproreina foi purificada através de cromatografia em Sephadex G-100 seguida de HPLC em DEAE-5PW-PAK e gel filtração em Sephacril S-200 HR. A separação em Sephadex G-100 (passo 1) foi feita com duas colunas em série com eluição em tampão AMBIC 0,05 M contendo 0,3 M de NaCl em pH 7,3 com fluxo de 14,5 mL/h. No segundo passo cromatográfico a fração ativa do passo anterior foi separada em DEAE-5PW-PAK com fluxo de 1 mL/min com dois gradientes lineares de NaCl 0,01 M Tris-HCl pH 8,0, com 0 até 0,25 M e 0,25 até 0,5 M. No terceiro passo, foi utilizada uma coluna Sephacril S-200 HR, com fluxo de 0,76 mL/h e 0,01 MTris-HCl com 0,2 M NaCl em pH 8,0.

Andrião-Escarso et al. (1997), isolaram e caracterizaram um segundo fator de coagulação "*trombina-like*" da peçonha através de cromatografia em Sephadex G-75 equilibrada e eluida em 0,05 M de formiato de amônia em pH 3,5 a 5^0C com fluxo de 30 mL/h de onde foram obtidas 5 frações (S_I - S_V), das quais a fração $S-_{II}$ foi eluida em cromatografia DEAE-cellulose em tampão fosfato de sódio 0,01 M, com fluxo de 15 mL/h, pH 7,4 a 5^0C até o tubo número 75, e em seguida o gradiente usado foi de NaCl de 0,05 M até 0,5 M, de cujas 6 frações obtidas ($D-_I$ - $D-_{VI}$), a fração número 5 ($D-_V$) mostrou atividade coagulante, tendo aproximadamente, Mr 37,5 kDa em SDS-PAGE e pI 5,19.

Mazzi et al. (2004) purificaram uma metaloprotease nomeada de BjussuMP-I através de uma combinação de passos cromatográficos de gel filtração e de interação hidrofóbica. A partir da purificação da peçonha bruta em Sephacryl S-200 (Tampão 0,01 M Tris-HCl, pH 7,6, com fluxo de 24 mL/h), o pool em que foi observada ação hemorrágica (BJ-I) foi ressuspendido e colocado em uma coluna de Phenyl Sepharose CL-4B (Tampão 0,01 M Tris-HCl) com gradiente de 4 M até 0 M de NaCl, pH 8,6), de onde se obtiveram a separação em 7 frações (BJ-I-S_I até BJ-I-S_{VII}), sendo a fração BJ-I-S_{VI} denominada de BjussuMP-I, com seu grau de pureza constatado por HPLC. Esta foi a primeira metaloprotease com ação hemorrágica de 60 kDa e pI 5,5 purificada da peçonha de *B. jararacussu.* Esta proteína também apresentou ação edematogênica, porém não apresentou ação miotóxica. Em 2007, Marcussi e colaboradores, purificaram também uma metaloprotease ácida de baixa massa molecular (Mr 24 kDa) e pI 6,5 sem ação hemorrágica, miotóxica ou letal, porém tendo mostrado ação anti-plaquetária, proteolítica sobre fibrinogênio, colágeno, fibrina, caseína e gelatina, permanecendo estável em diferentes pHs e temperaturas. Esta metaloprotease, chamada de Bjussu-II, foi purificada através de

cromatografia em CM-Sepharose, tampão AMBIC 0,05 M, pH 8,1, com utilização de gradiente até 1 M, com fluxo de 24 mL/h, onde foi obtido 6 frações (J_I - J_{VI}) sendo a J_{II} cromatografada em coluna Phenyl-Sepharose, com fluxo de 3 mL/tubo em tampão 0,05 M Tris-HCl, pH 7,4, seguido de gradiente decrescente de NaCl (4-0 M) denominada de BjussuMP-II, cujo grau de pureza foi constatado por HPLC.

Nos últimos 30 anos muito tem se pesquisado sobre os componentes da peçonha de *B. jararacussu* sendo purificadas e caracterizadas diversas toxinas, acredita-se que os fatores de coagulação, bem como as metaloproteases, contribuem para o processo de degradação muscular e atividade edematogênica causados nas vitimas de acidentes com esse tipo de serpente, sendo especialmente importante neste processo, a ação das miotoxinas.

Dentre as serpentes do gênero *Bothrops*, a peçonha de *B. jararacussu* é peculiar apresentando algumas características incomuns como uma intensa atividade miotóxica fruto principalmente das atividades da Bothropstoxina-I, uma Lys49 PLA_2 – símile e da Bothropstoxina-II, uma Asp49 PLA_2 - descritas no item Miotoxinas (1.2.2.). Sendo estas duas, as proteínas majoritárias na peçonha desta espécie, representando cerca de 15% e 7% do total de proteínas do veneno, respectivamente (HOMSI-BRANDEBURGO, 1988). Pode-se destacar ainda, que são as principais responsáveis pela evolução do quadro clínico relacionados às complicações locais do tipo necrose e intenso edema cujos efeitos podem comprometer tecidos e estruturas como músculo e tendões, eventualmente pode haver a evolução do quadro podendo inclusive ser necessária a amputação do membro afetado.

1.2. Peçonhas de serpentes

As peçonhas de serpentes em geral são, provavelmente, as mais complexas de todas as peçonhas animais conhecidas, sendo compostas por 20 ou mais componentes diferentes, em que mais de 90% do peso seco é constituído por proteínas com uma grande variedade de enzimas, e uma parte não protéica composta por carboidratos, lipídios, metais, aminoácidos livres, nucleotídeos, entre outros (VARANDA; GIANNINI, 1999). Os componentes tóxicos e não tóxicos das peçonhas tanto exercem sua atividade quanto potencializam a atividade de outros componentes. Estes componentes foram evolutivamente selecionados e tiveram papéis centrais na adaptação e diversificação das serpentes por permitir a defesa contra atacantes de rivais e a imobilização, morte e digestão de suas presas (LOMONTE; RANGEL, 2012, TAKEDA, 2012; CALVETE et al., 2005).

Nelas se incluem citotoxinas, cardiotoxinas, fatores de crescimento de nervos, lectinas, inibidores enzimáticos e várias enzimas, como proteases, fosfolipases A_2 (PLA_2s), metaloproteases, serinoproteases, fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, L-aminoácido oxidases, catalases, ATPases, hialuronidases, NAD nucleosidase e β- glucosaminidases (TU, 1996).

Além desta grande variedade de componentes, as serpentes apresentam em suas peçonhas, diferenças intra e interespécies quanto à proporção destes. Esta diferença é devido a fatores particulares como: idade, gênero, alimentação, clima, origem geográfica, vegetação, entre outros (BOLDRINI-FRANÇA, 2010; GUTIÉRREZ et al., 2009; SAAD et al., 2012).

Um fato interessante relacionado à peçonha de *B. jararacussu* está relacionado à dieta da espécie. Sendo esta bastante heterogênea, esta questão biológica se faz importante, no contexto da saúde pública, visto que há uma relação direta da composição bioquímica da peçonha com a dieta do animal (AMARAL, 1927; MARQUES et al, 2001). A peçonha da serpente *Bothrops jararacussu* é composta por diversas moléculas biologicamente ativas, como proteínas e peptídeos, as quais apresentam importante função na fisiopatologia do envenenamento por esta serpente (SANTOS-FILHO, 2011). Essas toxinas são capazes de gerar efeitos locais e sistêmicos durante o envenenamento, pela sua ação em diversos alvos biológicos. Dentre os efeitos locais, a formação de edema devido ao processo pró-inflamatório, a hemorragia e a necrose tecidual são sinais clínicos bastante evidentes no envenenamento (JÚNIOR, 1997). Toxinas isoladas da

peçonha dessa serpente são decritas por induzirem esses processos como é o caso de metaloproteases, como a BjussuMP-I (MAZZI, 2004) e BjussuMP-II (MARCUSSI, 2007), e fosfolipases A_2, como as BthTX-I e BthTX-II (COSTA, 2002; BONFIM, 2001; CINTRA et al., 1993). A atividade hemorrágica da peçonha é caracterizada por toxinas que degradam proteínas da matriz extracelular (MAZZ, 2007) chamadas de hemorraginas, atuando diretamente sobre os vasos causando sua ruptura e acarretando em sangramento, mesmo em locais distantes da picada, como a metaloprotease BlaH1 (BORKOW, 1995). Já sobre os efeitos sistêmicos, as patologias envolvendo distúrbios de coagulação apresentam uma grande importância clínica nos pacientes acometidos pela ação de toxinas que atuam sobre a hemostasia e agem sobre diversos eventos intravasculares (JÚNIOR et al., 1997). Dentre as toxinas hemostaticamente ativas, podemos citar a Jararacussin-I, uma serinoprotease thrombin-like capaz de induzir a ação pró-coagulante através da clivagem do fibrinogênio e indução da formação da rede de fibrina (BORTOLETO et al., 2002).

Os componentes desta peçonha podem ainda causar comprometimento renal agudo devido à nefrotoxicidade de suas proteínas agindo em conjunto sendo capazes de causar desbalanço na homeostasia, através da formação de trombos, causados pelas hemorraginas que são enzimas proteolíticas como serinoproteases e metaloproteases (KAMIGUTI, 1991) e pela destruição da musculatura com consequente liberação de proteínas quinases - devido à ação das miotoxinas (SANTOS-FILHO, 2011). Desta forma, possuindo toxinas bastante heterogêneas como histaminas, peptídeos potencializadores de bradicinina, fosfolipases A_2, esterases, metaloproteases, entre outras, o que faz com que a peçonha de serpentes *B. jararacussu* desencadeem uma variedade de ações tóxicas que em conjunto causam grandes problemas a saúde da vitima (CORREA-NETTO, 2007).

1.2.1. Fosfolipases A_2 (PLA_2)

As fosfolipases A_2 (PLA_2s; E.C.3.1.1.4) são enzimas que estão amplamente distribuídas dentre os organismos vivos sendo encontradas em fluídos biológicos e células, bem como em bactérias, plantas, tecidos de mamíferos – pulmão, fígado, baço e coração - e também em seu sangue, também desempenham diversas funções biológicas como metabolismo de fosfolipídeos, transdução de sinal, remodelação da membrana para sinalização, defesa antimicrobiana, metabolismo, reprodução, inflamação, hemostasia e muitos outros, além de ter papéis importantes

em vários processos fisiológicos e em algumas patologias. Estudos sugerem ainda, que essas enzimas possam, dentre suas diversas isoformas, estar envolvidas em doenças como aterosclerose, sepse, obesidade reumatismo, osteoartrite, asma, psoríase, esquizofrenia, Alzheimer e câncer (GIGLIO, 2003; MURAKAMI, 2008; LOMONTE; RANGEL, 2012; QUACH, 2014; GHAZARYAN et al., 2015).

São classificadas como PLA_2s intracelulares (geralmente associada à membrana e estão envolvidas em funções celulares, como metabolismo de fosfolipídeos) e PLA_2 extracelulares (sendo encontradas no suco pancreático de mamíferos e peçonhas de serpentes e insetos, possuindo funções diversas) (DENNIS et al., 2011; ARNI; WARD, 1996). As PLA_2s estão envolvidas na hidrólise de fosfolipídeos constituintes de conjuntos organizados como membranas, vesículas ou micelas (LOMONTE & RANGEL, 2012). Estas enzimas catalisam especificamente a hidrólise na ligação éster do carbono 2, liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos, em uma reação dependente de cálcio (ARNI; WARD, 1996; KUDO; MURAKAMI, 2002).

As fosfolipases A_2 constituem uma superfamília de diferentes enzimas pertencentes a pelo menos 15 grupos e seus subgrupos, sendo divididos em seis grandes tipos distintos: PLA_2s secretadas ($sPLA_2$), dentre estas estão as PLA_2 encontradas em peçonhas de serpentes; PLA_2s citosólicas ($cPLA_2$); PLA_2s Ca^{2+} independentes ($iPLA_2$); acetil-hidrolases fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH); as lisossomais ($LyPLA_2$s) e as mais recentemente descobertas associadas à lipoproteinas ($AdPLA_2$s). O sistema de classificação agrupa as PLA_2s considerando sua origem, sequência de aminoácidos, mecanismos catalíticos, localização, relação evolutiva e suas características bioquímicas adicionais, funcionais e estruturais. (DENNIS et al., MURAKAMI et al., 2011; QUACH, 2014).

As PLA_2s secretadas ($sPLA_2$) encontradas em peçonhas animais possuem 12-15 kDa e aproximadamente 119-134 aminoácidos (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011), conformações tridimensionais e maquinarias catalíticas bem conservadas e foram subdivididas em três grupos: I, II e III, de acordo com suas características estruturais e padrões de ligações de dissulfeto. As PLA_2s de peçonhas de serpentes ($svPLA_2$s) estão classificadas no grupo I (*Elapidae*) e II (*Viperidae*), já as PLA_2s presentes no grupo III são encontradas em abelhas e escorpiões. As enzimas das peçonhas de serpentes da família *Viperidae*, estão classificadas no grupo IIA (SIX; DENNIS, 2000; RODRIGUES et al., 2004; LOMONTE; RANGEL, 2012).

São observadas diferentes ações tóxicas nas PLA_2s de peçonhas de serpentes, algumas com ações neuronais, outras miotóxicas, outras com ambas as ações e ainda, PLA_2s farmacologicamente inativas. A homologia estrutural das PLA_2s, como a dobra tridimensional e maquinaria catalítica conservada sugerem uma evolução convergente das propriedades tóxicas de dois genes ancestrais comuns para as famílias *Elapidae* e *Viperidae* (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011). Um evento evolutivo ocorrido na família *Viperidae* representou o surgimento de um novo subgrupo de PLA_2 que perdeu sua capacidade de hidrolisar fosfolipideos após substituição em seu sitio catalítico do resíduo Asp49 por um resíduo de Lys49 (e menos frequentemente por Ser, Arg, Gln ou Asn). A Asp49 é essencial para a ligação do co-fator Ca^{2+} e atividade catalítica, sua substituição por Lys49 e mudanças no sítio de ligação do Ca^{2+} interfere na conformação tetraédrica da proteína impedindo sua ligação ao Ca^{2+}, levando a uma grande diminuição ou completa perda da atividade enzimática. Contudo, observa-se nos homólogos como Lys49 outras ações tóxicas que independem da atividade catalítica, como a miotóxica e a citotóxica (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997; OWNBY et al., 1999; GHAZARYAN, 2015). Evidências mostram também para algumas PLA_2s-símile Lys49, que a atividade miotóxica é independente da atividade fosfolipásica de algumas toxinas (SELISTRE DE ARAUJO et al., 1997).

1.2.2. Miotoxinas

A necrose muscular é um efeito local relevante induzido por miotoxinas presentes em peçonhas de serpentes especialmente as do gênero *Bothrops,* as quais estão envolvidas na maioria dos acidentes ofídicos no Brasil (DE PAULA, 2010). A mionecrose é ocasionada principalmente pelas ações das miotoxinas Asp49 e Lys49 sobre o músculo esquelético, que após sua injeção leva a uma grande liberação de proteínas creatina cinase muscular ocasionando uma perda permanente do tecido e da habilidade do membro atingido deixando grandes sequelas e podendo levar à sua amputação (NISHIOKA, 1992; GUTIÉRREZ, 1995).

Embora todas as miotoxinas presentes em peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* tenham estruturas semelhantes à de PLA_2, algumas delas não possuem atividade catalítica uma vez que tiveram a substituição de um aminoácido de Asp49 por um de Lys49, fato que impediu a ligação do Ca^{2+} no sitio de ligação

dessas proteínas, tornando-as cataliticamente inativas (LOMONTE; RANGEL, 2012; OWNBY et al., 1999; GHAZARYAN, 2015).

Após a descoberta da primeira PLA_2 miotóxica botrópica: MIOTOXINA I de *B. asper* (GUTIERREZ, 1984), foram descobertas e caracterizadas outras PLA_{2s} miotóxicas presentes em peçonhas de diferentes serpentes, algumas com atividades catalíticas e outras não (GUTIERREZ, 1995).

As PLA_2s-símile Lys49 ou "*PLA_2-like*" *protein* ou ainda Lys49 miotóxica induzem a mionecrose local quando injetadas intramuscularmente através de mecanismos de perturbações na integridade da membrana (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000), ao permitir um influxo descontrolado de Ca^{++} e Na^{+} levando a alterações intracelulares e à morte da célula (LOMONTE, 2003; LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011).

No gênero *Bothrops*, as PLA_2s constituem o principal componente dentre suas peçonhas e tem sido amplamente estudadas. Duas PLAs básicas presentes na peçonha de *Bothrops jararacussu* mostraram ser uma das maiores responsáveis pela atividade miotóxica, sendo uma com baixa atividade catalítica, Asp49 PLA_2 (Bothropstoxina-II, BthTX-II) e outra cataliticamente inativa, Lys49 PLA_2 (Bothropstoxina-I, BthTX-I) (CINTRA et al., 1993; HOMSI-BRANDEBURGO et al.,1988). Inicialmente os processos de purificação destas miotoxinas eram feitos de acordo com Homsi-Brandeburgo et al. (1988) e com o surgimento de novas colunas cromatográficas bem como a descoberta de outras proteínas nos venenos desta serpente, como as metaloproteases e serinoproteases, os métodos de purificação dessas miotoxinas foram aprimorados e simplificados por Cintra et al. (1993), como descrito no item no item 1.1.1., de forma a não se ter a perda de atividade dessas proteínas, como por exemplo, em pH 3,5 e formiato de amônio, onde embora não interferisse na atividade das BthTX-I e II, poderia haver a perda ou diminuição de atividade das demais proteínas.

No fim da década de 90, começou-se a isolar os componentes das peçonhas de *Bothrops moojeni* usando cromatografia de troca iônica em colunas de CM-Sepharose previamente equilibradas com bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05 M, pH 8,0, eluindo-os com gradiente até 0,5 M de AMBIC em pH constante (8,0) (SOARES et al., 1998). Em 2000, Andrião-Escarso e colaboradores isolaram PLA_2 miotóxicas de peçonhas de oito serpentes *Bothrops spp.* utilizando *i*nicialmente uma cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose, inclusive de *B. jararacussu.* No presente trabalho, a purificação das toxinas foi feita de acordo com método proposto

por Cintra et al. (1993) com modificações, sendo utilizada uma cromatografia de exclusão molecular em coluna G75 para separar as proteínas por tamanho e em seguida foram separadas através de suas cargas com a utilização da CM-Sepharose, obtendo-se assim as miotoxinas BthTX-I e BthTX-II.

A BthTX-I é uma proteína básica, Lys49 PLA_2, sendo composta por 121 resíduos de aminoácidos, com pI 8,2 e Mr 13.700 Da. Ela é uma das proteínas responsáveis pela miotóxicidade causada pela peçonha de *B. jararacussu* sendo ainda indutora de citotoxicidade, de edema, capaz de bloquear a transmissão neuromuscular, de hiperalgesia e letal, no entanto, ela não apresenta atividade catalítica detectável sobre fosfolipídeos (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; CINTRA et al., 1993; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000). Sua estrutura cristalina são duas formas diméricas com difrações em raio-x determinadas como 3.1 e 2.1 angstroms, seus monômeros estão relacionados por um eixo de rotação sendo que as interfaces do dímero está voltada para região alfa-hélices N-terminal e as pontas beta do monômero adjacente. Há diferenças com relação a orientação dos monômeros nas duas formas cristalinas, resultando em dímeros de conformações “abertas” e “fechadas”. Diferenças intrínsecas na fluorescência emitida são devido ao resíduo de triptofano localizado na interface dos dímeros, as quais foram mostradas através de espectroscopia e são possivelmente relevantes na sua atividade deletéria (DA SILVA, 1998; ARNI, 1995).

A BthTX-II é uma Asp49 PLA_2 também básica, possui em sua composição 122 resíduos de aminoácidos tendo um pI de 8,5 e Mr de 13.900 Da, porém apresenta atividade catalítica. A BthTX-II apresenta, além de baixa atividade fosfolipásica, considerável atividade miotóxica, citotóxica, anticoagulante, hemolítica, indução de agregação plaquetária sendo também letal (BONFIM et al., 2001). Sua estrutura cristalina mostrou difração de 2.2 e, assim como outras PLA_2s do grupo II, possui estrutura dimérica com 7 pontes de sulfeto em cada monômero, a BthTX-II possui ainda alfa-hélice N-terminal, uma “short” hélice, um loop de ligação ao Ca^{2+}, duas alfa-hélices anti-paralelas, duas cadeias curtas anti-paralelas tipo folhas β e um loop C-terminal (BORTOLETO, 1996; CORREA, 2008). O sinergismo entre Asp49 PLA_2s e PLA_2 homólogas em relação às suas ações de permeabilização da membrana demonstradas *in vitro*, através de lipossomas 118 e culturas C2C12 pode fornecer uma explicação adaptativa para a presença de ambos os tipos de PLA_2s miotóxicas dentro de um único veneno, como frequentemente encontrado na família V*iperidae* (CINTRA-FRANCISCHINELLI, 2009; LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011).

Os agentes tóxicos presentes nos venenos de serpentes, bem com as toxinas BthTX-I e BthTX-II da peçonha de *B. jararacussu,* induzem reações inflamatórias com formação de edema e influxo de leucócitos no local atingido. A formação do edema ocorre, além de outros fatores, também pela liberação dos eicosanoides (SERHAN, 1994) e seus mediadores inflamatórios como leucotrienos, lipoxinas, prostaglandinas (PG), prostaciclinas e tromboxanos. A síntese desses mediadores ocorre através da cascata do ácido araquidônico, o qual tem seu início com a ação catalítica da fosfolipase A_2 sobre a membrana citoplasmática. Sabe-se que as prostaglandinas (PGs) são catalisadas a partir do ácido araquidônico pelas enzimas ciclooxigenases (COX) e dentre as PGs, a E_2 (PGE_2) contribui para o aumento da pressão sanguínea e sensibilidade à dor (GIULIANO & WARNER, 2002) podendo, juntamente com a ação de outros mediadores inflamatórios, causar ainda hiperalgesia, vasodilatação, com aumento na permeabilidade vascular e extravasamento de fluidos em tecidos adjacentes, fato que leva a formação de edema (HARRIS, 2002). Olivo et al., (2007) em seu trabalho sugeriu que as PLA_2s das peçonhas teriam importantes papéis na expressão das enzimas COX-1 e COX-2 cujos produtos (como as PGs) mediariam, pelo menos parcialmente, a capacidade das peçonhas de *B.jararaca e B. asper* de induzir edema.

Os mecanismos de ações miotóxicas das PLA_2s-homólogas Lys49 ainda não estão esclarecidos por completo, no entanto, de acordo com alguns autores a região C-terminal (aminoácidos 115-129) seja o principal domínio estrutural responsável pelo efeito tóxico (especialmente o citotóxico) dessas miotoxinas sendo responsáveis pelas lesões causadas nos sarcolemas envolvidos nos processos de permeabilização de ions na membrana (NUÑES, 2001; LOMONTE et al., 2010; CINTRA-FRANCISCHINELLI, 2009). Cintra-Francischinelli et al. (2010), demonstraram através de ensaios com miotúbulos C2C12, que a região C-terminal está envolvida no mecanismo de permeabiliação do Ca^{2+} extracelular através da membrana plasmáticas, no entanto, as lesões causadas pelos peptídeos da região C-terminal são independentes da presença do $Ca^{2+,}$ Ademais, esta região possui resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos que contribuem para o mecanismo de dano de membranas celulares. Os resíduos catiônicos podem interagir com grupos aniônicos de um sítio receptor nos fosfolipídeos da membrana (LOMONTE et al., 2003), enquanto que os resíduos hidrofóbicos poderiam desestabilizar as membranas e permeá-la através de sua interação com seus fosfolipídeos (NÚÑEZ et al., 2001). Lomonte et al. (2003) sugeriram a possibilidade

de que outras regiões da molécula poderiam participar ou complementar a ação tóxica local dessas proteínas. Complementando esta hipótese, Cintra-Francischinelli et al. (2010) sugeriram ainda a existência de receptores de membranas específicos para toxinas, tanto as Asp49 quanto as Lys49 homólogas, acoplados ao armazenamento intracelular de Ca^{2+}, contribuindo, portanto, para o mecanismo da miotoxicidade.

Diferentemente desta hipótese, os peptídeos da região C-terminal não mostraram nenhuma atividade de dano direto à membrana em PLA_2s Asp49 miotóxicas, sugerindo, assim, que o mecanismo de toxicidade exercido por elas provavelmente envolva sua atividade catalítica sobre os fosfolipídios, sendo este portanto, um evento relevante para sua miotoxicidade, diferente do utilizada pelas PLA_2s-símiles Lys49 miotóxicas (NUÑEZ et al., 2001; SANTOS-FILHO, 2011). Segundo essa hipótese, alguns estudos têm sugerido que PLA_2s Asp49 miotóxicas possam induzir dano muscular por afetar a integridade das membranas plasmáticas (FULY et al., 2003; SANTOS-FILHO et al., 2008). Sendo membranas são formadas por diferentes tipos de fosfolipídeos, como fosfatidilcolina, eles podem ser hidrolisados por PLA_2sAsp49 tendo como resultado a liberação de lisofosfolipídeos e ácidos graxos livres, levando ao dano celular e também atividades inflamatórias com consequente formação de edema (SANTOS-FILHO et al., 2008), com foi observado neste trabalho com a PLA_2Asp49 BthTX-II.

1.3. Inibidores de ações tóxicas de peçonhas de serpentes

Na natureza, através da evolução filogenética, alguns mamíferos e répteis desenvolveram resistência natural a algumas toxinas presentes em peçonhas de serpentes sendo capazes de neutralizá-las através de fatores ativos em seus sangues contra atividades tóxicas das peçonhas (FORTES-DIAS, 2002; SANCHES, 2008).

Inibidores naturais de plantas possuem um importante papel quanto ao potencial de neutralização de efeitos tóxicos causados pelas proteínas e enzimas presentes em peçonhas de serpentes. Com mecanismos de ação ainda pouco entendidos, constituintes presentes em algumas plantas (como Alcalóides; Flavonóides; Neoflavonóides; Sitosterol; Taninos, entre outros) podem inibir efeitos tóxicos de venenos interagindo com alvos macromoleculares como enzimas e receptores. Alguns autores já descreveram a presença de inibidores de ações tóxicas das peçonhas de serpentes em plantas como *Withania somnifera (*ginseng indiano), *Cordia verbenácea (*erva baleeira ou maria-milagrosa), *Piper sp*, *Bauhinia forficata* (Pata-de-vaca), *Plathymenia reticulata* (paricazinho ou pau-amarelo) , *Dipteryx odorata* (cumaru), *Bellucia dichotoma* (Goiaba-de-anta) (DEEPA; GOWDA et al., 2002; TICLI et al., 2005; NÚÑEZ et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005; MOURA, 2014, 2015), no soro de mamíferos como *Didelphis sp (*Gambá) (TRENTO et al., 2001; ROCHA et al., 2002), e também de plasma de serpentes (LIZANO et al., 2003; QUIRÓS et al., 2007; SHIMADA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008; SANTOS-FILHO et al., 2011; MOORJAN, 2014; PALACIO, 2014).

Diversas partes das plantas estão correlacionadas a atividade anti-ofídica, especialmente as raízes, cascas e folhas sendo o gênero *Bothrops* aquele com maior inibição dessa atividade por plantas**.** Estudos têm revelado que extratos e frações de algumas plantas usadas na medicina tradicional são capazes de antagonizar a atividade de venenos e toxinas: *Eclipta sp.*, *Curcuma longa*, *Hibiscus esculentus*, *Casearia sp.*, *Piper sp.*, *Cordia verbenacea*, *Pentaclethra macroloba, Plathymenia reticulata* e outras. (MARTZ, 1992; MORS et al., 2000; TICLI et al., 2005, OLIVEIRA et al., 2005; HAGE-MELIM et al., 2013).

Estudos foram e estão sendo feitos com componentes bio-ativos de plantas a fim de investigar suas possíveis potencialidades de neutralizar efeitos tóxicos de componentes presentes em peçonhas, sendo as mais estudadas com relação às de serpentes. Como exemplos, podem ser citados os Flavonóides e Neoflavonóides,

inibidores de PLA_2 e de edema; o ácido rosmarinico (RA), isolado de *Cordia verbenacea* conhecida como “erva baleeira”, mostrou potencial de inibição da atividade miotóxica e edematogênica das PLA_2s BthTX-I and BthTX-II de *B. jararacussu* (TICLI et al., 2005; HAGE-MELIM et al., 2013; SAMY, 2012). Frações de *Eclipta prostrata (Asteraceae*) possuem ação anti-miotóxica em venenos de *Crotalus durissus e a* fração purificada por MELO et al. (1994) chamada de *Wedelolactone* mostrou potencial de neutralizar o efeito miotóxico de venenos de: *B. jararaca, B. jararacussu e Lachesis muta.*

Assim como extratos de algumas plantas, certos organismos marinhos possuem alto potencial de neutralizar fosfolipases A_2 de venenos de serpentes ($svPLA_2$), tendo por exemplo, potentes ações anti-inflamatórias (SAMY, 2012). Produtos naturais de organismos marinhos inibidores de PLA_2 são os terpenóides, como os manoalídeos e seus derivados, como escalaradial, pseudopterosinas e compostos sintéticos. Manoalídeos (MLD) são sesquiterpenóides que possuem pelo menos um grupo reativo aldeído tendo atividade anti-inflamatória por inibir a PLA_2 através de ligações irreversíveis com diversos resíduos de lisina realizadas por meio de duas funções aldeído presentes na parte polar. Dos seus dois grupos aldeído, apenas o presente no anel g-hidroxibutenolideo parece ser essencial, análogos desprovidos do segundo grupo aldeído também mostraram serem inibidores irreversíveis de PLA_2 (SAMY, 2012). Manoalídeos isolados de esponja marinha *Luffariella variabilis* mostraram propriedades de inibir PLA_2, sendo potenciais agentes analgésicos e anti-inflamatórios. Estudos ainda demonstraram atividades imunossupressoras e anti-proliferativa, abrindo assim, perspectivas para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (SAMY, 2012).

Alguns mamíferos, como algumas espécies de ouriços, gambás e mongoose, possuem resistência contra componentes tóxicos presentes nas peçonhas de serpentes, os quais podem ser explicados pela presença de fatores (proteínas) neutralizantes desses componentes tóxicos como fatores anti-hemorrágicos e antineurotóxicos e/ou antimiotóxicos, identificados como metaloproteases e fosfolipases $A_{2,}$ respectivamente. O gambá *Didelphis marsupialis* lpossui inibidores em seu plasma que concede resistência natural a componentes tóxicos das peçonhas de serpentes como os que induzem danos locais com edema, mionecrose e hemorragia. Este animal possui pelo menos duas proteínas descritas como sendo anti-miotóxicas, denominadas DM64 e DM43 (ROCHA, 2002).

1.3.1. Inibidores naturais presentes nas serpentes contra ações tóxicas de suas próprias peçonhas

Historicamente, embora a resistência de alguns animais contra venenos de serpentes fosse conhecida, a substância neutralizante era ainda desconhecida, muitas vezes chamada de "entidade antitóxica". Pensava-se a princípio que a neutralização fosse devido a anticorpos presentes nos tecidos dos animais. Por outro lado, outros estudiosos sugeriam que não era através de reação antigeno-anticorpo, mas sim por degradação enzimática. Em 1969, Clark e Voris sugeriram que o fator antitóxico no soro de *Crotalus adamanteus* seria uma proteína homóloga à albumina. Era reportado que a "entidade" responsável pelas atividades anti-letais e anti-proteolíticas precipitavam na presença de $(NH_4)_2SO_4$, mais tarde Omori-Satoh (1972), purificou da serpente *Trimeresurus flavoviridis* um fator presente no soro que inibia a hemorragia causada por este veneno e também sua toxicidade letal, com peso molecular de 70.000 Da e ponto isoelétrico 4,0. Este soro ainda foi capaz de inibir a hemorragia causada também por peçonhas de *Crotalidae, Viperidae* e *Elapidae*. A partir de então, começou-se a busca e purificação destes fatores inibidores presentes em soros de serpentes e das toxicidades causadas pelas peçonhas, bem como suas caracterizações bioquímicas e funcionais. Os primeiros PLIs purificados e caracterizados foram os de *Trimeresurus flavoviridis* (KIHARA, 1976) e de *Vipera palestinae* (OVADIA et al., 1977), sendo que neste último já se supunha a formação de um complexo estável entre a proteína neutralizante e um componente neurotóxico da fração da peçonha.

Assim, com o advento de novas técnicas cromatográficas e aparelhagens, passaram a ser extensamente estudadas, purificadas e caracterizadas tanto as moléculas indutoras das atividades tóxicas presentes nas peçonhas de serpentes (enzimas e proteínas), quanto as moléculas que inibiam essas atividades tóxicas e estavam presentes no sistema circulatório das serpentes, dentre elas as fosfolipases A_2 (PLA_2), componente presente em grande quantidade na peçonha da grande maioria das serpentes e que possui uma extensa variedade de efeitos farmacológicos como: cardiotóxico, neurotóxico, citotóxico, nefrotóxico, miotóxico, hipertensor e edematogênico, entre outros (THWIN et al., 2010).

Recentemente foi realizado em nosso laboratório o isolamento e a caracterização de um inibidor de metaloprotease presente no soro da serpente B. alternatus. O inibidor, chamado de BaltMPI, mostrou-se efetivo na inibição da

atividade hemorrágica e proteolítica da Batroxase e BjussuMP-I, metaloproteases das classes P-I e P-III, respectivamente (PALACIO, 2014).

1.3.1.1. Inibidores de PLA_2 - PLI

As serpentes peçonhentas e não peçonhentas possuem em seu soro proteínas inibidoras de PLA_2s, denominadas de PLI (MARCUSSI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008). Uma hipótese possível para isto, seria autoproteção contra as enzimas da própria peçonha, que eventualmente, poderiam alcançar o sistema circulatório (FAURE, 2000; FORTES-DIAS, 2002; MARCUSSI et al., 2007).

Diferentes espécies de serpente já tiveram PLIs purificados e suas estruturas primárias determinadas a partir dos seus soros e plasmas (FAURE et al., 2000; DUNN; BROADY , 2001; FORTES-DIAS, 2002; MARCUSSI et al., 2007). PLIs são inibidores proteicos formados por glicoproteínas oligoméricas, globulares e ácidas cuja inibição enzimática é decorrente da formação de complexos solúveis com PLA_2s e miotoxinas (OVADIA et al., 1977; DOMONTet al., 1991; THWIN; GOPALAKRISHNAKONE, 1998; DUNN, 2001; LIZANO et al., 2003) e estão presentes no sangue destes animais mesmo antes de uma possível exposição aos componentes da peçonha.

Os inibidores de PLA_2s, provenientes do plasma de serpentes, podem ser classificados em três tipos α, β e γ de acordo com os aspectos estruturais, e podem neutralizar ações fosfolipásicas, miotóxicas, neurotóxicas, inflamatórias e dematogênicas das peçonhas, no entanto, os seus mecanismos de ação ainda permanecem desconhecidos, necessitando-se de maiores informações em nível estrutural e funcional. Os três tipos de PLIs foram identificados nos soros de serpentes *Viperidae*, já nas Hydrophidae e *Elaphidae* foram identificados apenas γPLIs (THWIN et al., 2002; THWIN et al., 2010).

Os inibidores do tipo alfa (PLIαs), isolados do plasma de serpentes Crotalinae como *Trimeresurus flavoviridis* (KOGAKI et al., 1989), *Agkistrodon blomhoffii* (OHKURA et al., 1993), *Bothrops asper* (LIZANO et al., 1997), *Bothrops moojeni* (SOARES et al., 2003), *Atropoides nummifer* (QUIRÓS et al., 2007) *Protobothrops flavoviridis* (SHIMADA et al., 2008), *Bothrops jararacussu* (OLIVEIRA et al., 2008) e *Bothrops alternatus* (SANTOS-FILHO, et al., 2011), são glicoproteínas ácidas de 75 a 120 kDa constituídas por três a seis subunidades (FAURE,2000) e possuem similaridade estrutural (SANTOS-FILHO et al., 2011).

Os αPLIs tem-se apresentados eficientes neutralizadores dos efeitos miotóxicos de algumas PLA_2s. Aqueles purificados a partir de plasma de serpentes do gênero *Bothrops*, demonstram certa especificidade por miotoxinas PLA_2s-símile Lys49, as quais possuem grande número de resíduos catiônicos e hidrofóbicos, contudo, o motivo dessa especificidade e o tipo de interação entre os αPLIs/PLA_2s ainda não foi elucidado. A característica mais comum entre os αPLIs é a presença de um domínio em suas sequências, homólogo ao domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) de lectinas Ca^{2+}-dependentes (tipo C), representada pela proteína ligante de manose e apoproteína surfactante pulmonar SP-A e receptores tipo-M para PLA_2s secretadas (INOUE et al., 1997; SANTOS-FILHO, et al., 2011). Esta região abrange cerca de 67% de cada sequência primária dos monômeros dos PLIs e é a porção mais conservada dessas moléculas, com média de 46% de identidade de sequência entre as espécies (LIZANO et al., 2000).

Outra classe de PLIs são os βPLIs, os quais foram isolados das espécies de serpentes como *Agkistrodon blomhoffii siniticus* (OKUMURA et al., 1998), *Elaphe quadrivirgata, E. climacophora* (OKUMURA et al., 2002; SHIRAI et al., 2009) e *Lachesis muta* (LIMA, 2011). Esses inibidores são glicoproteínas ácidas globulares de 160 kDa, compostos de três subunidades monoméricas de 308 aminoácidos com quatro sítios de N-deglicosilação por unidade. A característica estrutural desta classe é o fato de terem estruturas com repetições ricas em leucina e demonstram similaridade com a α2-glicoproteína humana (OKUMURA et al., 1998). Esses inibidores inibem somente PLA_2s básicas do grupo II isoladas de peçonhas de serpentes (OKUMURA et al., 2002).

O terceiro tipo de PLI, conhecido como γPLIs, é o mais encontrado até o momento sendo também bastante estudados, foram isolados das espécies de serpentes como *Naja naja kaouthia* (OHKURA,1994); *Trimeresurus flavoviridis* (NOBUHISA,1997); *B. jararacussu* (OLIVEIRA et al., 2011); *Crotalus durissus collilineatus* (GIMENES et al., 2014). Os γPLIs são glicoproteínas ácidas com massa de 90-130 kDa, compostos por 3-6 subunidades ligadas não covalentemente de massa 20-31 kDa, cujas sequências de aminoácidos contêm dois conjuntos padrões de resíduos de cisteína, responsáveis pela formação dos motivos “três dedos” (*three-finger motif*) (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008; FAURE, 2000).

Embora muitas pesquisas têm sido feitas quanto à caracterização dos inibidores naturais de toxinas de serpentes, estas pesquisas têm enfrentado desafios, como a necessidade de descoberta de novos inibidores (tanto de plantas,

mamíferos, serpentes e etc...) e a baixa disponibilidade de soro/plasma e sua dificuldade de obtenção em quantidades suficientes para ensaios de atividades funcionais, bioquímicas e estruturais. No caso das serpentes, por exemplo, a obtenção de PLIs a partir de seus plasmas ou soros esbarra em questões éticas e ambientais, uma vez que para obtê-los é necessário o sacrifício da serpente e ainda assim, a quantidade obtida dos PLIs muitas vezes é insuficiente.

Assim, a expressão heteróloga de PLIs através de técnicas de biologia molecular contribui enormemente para seus estudos uma vez que torna a obtenção de PLIs independente do soro da serpente, deixando este de ser um limitante e sendo possível então obtê-los em quantidades necessárias para explorar uma elevada gama de ensaios laboratoriais *"in vivo"* e *"in vitro"*. Além de aumentar a disponibilidade dos inibidores de svPLA_2s, há ainda o fator positivo da questão ecológica, uma vez que não haverá necessidade de sacrificar serpentes.

1.3.1.2. αBaltMIP – um Inibidor de PLA_2

Devido à complexidade dos sintomas do envenenamento e ao elevado índice de acidentes ofídicos, a procura por inibidores de toxinas de peçonhas de serpentes é de grande importância para a produção de antivenenos mais eficientes ou para a complementação da soroterapia utilizada atualmente. Desta forma, pesquisas têm sido realizadas em busca de inibidores naturais de PLA_2s de serpentes purificando-os e caracterizando suas estruturas bioquímica e estruturalmente.

Santos-Filho et al. (2011) isolaram um inibidor de PLA_2s do tipo-α (αPLI), de serpentes *B.alternatus* denominado αBaltMIP. Demonstraram ser este uma glicoproteina possivelmente oligomérica com subunidades com Mr ~24.000 Da, e fizeram a caracterização bioquímica parcial por determinação da massa molecular relativa e do sequenciamento N-terminal. Santos-Filho também fez algumas análises quanto a atividade inibitória do αBaltMIP com relação às ações tóxicas de algumas toxinas como bothropstoxinas I e II (BthTX-I e -II) de *Bothrops jararacussu*, piratoxinas I e III (PrTX-I e -III), de Bothrops *pirajai e* crotoxina B (CB) de *Crotalus durissus terrificus*, sendo que este inibidor apresentou potencial para inibir atividades anticoagulante, hemolítica, citotóxica e miotóxica das toxinas testadas.

1.3.1.3. rBaltMIP – Um inibidor recombinante

Com o objetivo de sanar um dos gargalos na obtenção de material biológico para experimentos *"in vivo"* e *"in vitro"*, como as dificuldades em conseguir o inibidor nativo αBaltMIP do plasma da serpente *Bothrops jararacussu,* especialmente devido ao seu baixo rendimento e dificuldade em obtenção do plasma (o que requer o sacrifício do animal), Santos-Filho em sua tese de doutorado (2011) fez também a clonagem do αBaltMIP através de técnicas de biologia molecular, sequenciamento e análise do cDNA obtido por PCR. Assim, ele expressou em *Pichia pastoris* um inibidor recombinante do tipo-α (αBaltMIP) de *B.alternatus* nomeado de rBaltMIP o qual foi utilizado neste trabalho.

No presente trabalho, foram feitas as caracterizações estruturais, bioquímicas e funcionais deste inibidor a fim de complementar aquelas já obtidas em relação ao seu potencial de inibição das miotoxinas PLA_2Lys49 BthTX-I e da PLA_2Asp49 BthTX-II da peçonha de *B. jararacussu*. Para tal, foi feita a indução da expressão heteróloga do rBaltMIP conforme descrito por Santos-Filho et al. (2014).

1.4. O acidente ofídico

Os acidentes ofídicos causam considerável morbidade e mortalidade em todo o mundo sendo especialmente preocupantes nos países tropicais como Sul e Sudeste da Ásia, nas Américas e África Subsaariana. De acordo com a *Global Snakebite Initiative* (GSI) (2010), mais de 5 milhões de pessoas são acometidas por acidentes com serpentes no mundo, deixando seriamente feridas 2,7 milhões e levando 125 mil pessoas a óbito a cada ano (GSI; KASTURURATNE et al., 2008; GUTIÉRREZ et al., 2010; CRUZ et al., 2009; DE PAULA, 2010). O perfil epidemiológico mostra que predominantemente os acidentes ofídicos acometem indivíduos na faixa etária de 20 a 59 anos do sexo masculino (SINAN, 2015) sendo a sazonalidade uma característica marcante havendo o predomínio de incidência desses acidentes nos meses quentes e chuvosos (janeiro a abril) e sendo acometidos cerca de 20 mil pessoas anualmente no país.

A partir do ano de 2007, a Organização Mundial da Saúde tem categorizado os acidentes ofídicos como sendo doença negligenciada devido ao elevado número de acidentes, a população atingida (predominantemente homens, trabalhadores de comunidades rurais e em fase produtiva) e a complexidade do quadro clínico instalado. Embora os acidentes ofídicos representem um relevante problema de saúde pública, social e econômico, uma vez que as graves sequelas decorrentes dos envenenamentos causam incapacitação física do indivíduo impossibilitando-o de trabalhar e interferindo em sua qualidade de vida, eles ainda são negligenciados por muitas autoridades, sobretudo porque não estão incluídos em programas de cuidados primários na maioria dos países afetados (CRUZ et al., 2009).

No Brasil, desde 1990 foi desenvolvido pelo Ministério da Saúde o Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, sistema que tem como objetivo padronizar o processo de registro, de consolidação e de compartilhamento de dados de doenças e agravos de notificação compulsória (DNC) no Brasil, dentre os quais estão incluídos os acidentes ofídicos. No ano de 2014, de acordo com dados do Ministério da Saúde foram notificados 151.560 casos de acidentes ofídicos no Brasil sendo que do total de notificações referentes aos acidentes neste ano cuja serpente foi identificada, 81,71% foram ocasionados pelo gênero *Bothrops* (SINAN, 2015). Entretanto, vários autores sugerem que os dados possam estar subestimados havendo uma maior ocorrência de acidentes ofídicos visto que não se sabe ao certo a verdadeira magnitude das ocorrências uma vez que, apenas estão incluídos nas

estatísticas de saúde os casos em que houve hospitalização da vítima, sendo possível então haver um grande número de acidentes ofídicos que não tiveram atenção médica e consequentemente não foram notificados (WHO, 2010). No país embora a notificação desses acidentes seja obrigatória desde 1988, tem-se observado falta de continuidade nos registros epidemiológicos podendo estes dados, estarem subestimados.

As consequências mais frequentes dos acidentes ofídicos como os que ocorrem com a peçonha de *B. jararacussu,* por exemplo, são a amputação de extremidades, o déficit funcional e o comprometimento renal, sendo o óbito pouco frequente (FRANÇA & MÁLAQUE, 2003)**.** A intensidade dessas consequências dependerá de fatores como idade, habitat, a dieta e estado nutricional do animal no momento anterior ao acidente, uma vez que estes fatores, dentre outros apresentados neste trabalho, determinarão a quantidade de veneno injetada na vitima. A letalidade geral dos acidentes ofídicos é baixa (0,5%), sendo maior no acidente crotálico (1,9%) quando comparado aos demais (laquético: 0,9%, botrópico e elapídico-causado por serpentes do gênero *Micrurus*: 0,3%). No entanto, a frequência de sequelas, relacionada às complicações locais, é bem mais elevada, associada a fatores de risco como o uso de torniquete, picada em extremidades (dedos de mãos e pés) e retardo na soroterapia (MINISTÉRIO da SAÚDE, 2005). Assim, sequelas deixadas em indivíduos acometidos, além do problema de saúde como a decorrente amputação do membro, se deparam também problemas sociais, psicológicos e financeiros, visto que muitas vezes o indivíduo se torna invalido para exercer sua atividade de trabalho e prover seu sustento e de sua família. Devido a fatores como estes que levam ao comprometimento na qualidade de vida dos indivíduos, bem como a possibilidade do quadro evoluir para a rabdomiólise, levando a sérias complicações renais e até à morte, os acidentes ofídicos são tidos como um problema de saúde pública pois o indivíduo acometido corre o risco de necessitar de assistência social e médica prolongada constante.

O acidente causado pela serpente *Bothrops jararacussu* apresenta como característica comum ao gênero *Bothrops,* ação inflamatória e proteolítica, decorrentes das metaloproteinases, fosfolipases e serinoproteases responsáveis pelos fenômenos locais que atuam em diferentes pontos na cascata da inflamação; ação coagulante, devido a enzimas que atuam em pontos específicos da cascata de coagulação, levando ao consumo de vários fatores de coagulação e do fibrinogênio, resultando em incoagulabilidade sanguínea observada nesses envenenamentos e

ação hemorrágica atribuída, particularmente, às metaloproteinases (hemorraginas) e ação necrosante em músculos esqueléticos (VITAL-BRAZIL, 1982; AMARAL, 1985, CALDERON, 2003). Ele acarreta alterações locais e sistêmicas, após a picada, ocorrendo localmente pequeno sangramento pelos orifícios de inoculação do veneno. A dor, eritema e o edema se formam progredindo já nas primeiras horas havendo formação de bolhas no local de conteúdo variável (seroso, hemorrágico, necrótico, purulento), há perda muscular decorrente da miotoxicidade, podendo levar a sequelas graves, como a perda de tecido permanente e incapacidade ou amputação do membro (JÚNIOR et al., 1997; OTERO et al., 2002). As alterações sistêmicas são caracterizadas por incoagulabilidade sanguínea e hemorragias com formação de equimose e gengivorragia podendo haver queda da pressão e, embora raros, choques e rabdomiólise, podendo levar a mioglobinúria e insuficiência renal aguda (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985).

1.4.1. Tratamento do acidente ofídico

Em acidentes ofídicos algumas situações popularmente conhecidas devem ser evitadas, pois favorecem complicações no quadro de saúde do indivíduo acometido como torniquete ou garrote, incisões no local da picada e especialmente o retardo na administração do soro antiofídico. Deve-se também, remover anéis e pulseiras, não furar, não cortar, não fazer sucção no local da ferida e não aplicar folhas, pó de café ou terra sobre ela para não provocar infecção (CEVAP, 2015; MINISTÉRIO DA SAUDE, 2005).

As medidas de tratamento gerais primárias que devem ser tomadas em caso de picada por serpente são lavar o local com água e sabão, manter a vítima em repouso e o membro atingido elevado para facilitar a diminuição do edema. Manter o indivíduo hidratado e fazer uso de analsésicos para alívio da dor e deve-se levar a vítima imediatamente ao centro de saúde mais próximo para receber o tratamento antiofidico específico para o tipo de serpente (PINHO; PEREIRA, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

O tratamento específico de acidentes ofídicos consiste na administração o mais rápido possível do soro específico para cada tipo de envenenamento. Os antivenenos são derivados de animais (sendo mais comumente utilizados, os equinos) e existem três tipos de soros antiofídicos disponíveis no mercado brasileiro os quais foram desenvolvidos de acordo com as características dos constituintes das

peçonhas das diferentes espécies, são eles: soro antibotrópico (SAB) - para o tratamento de acidentes com jararacas e jararacussus; soro antibotrópico-crotálico (SABC) – para o tratamento de acidentes com jararacas e cascavéis; e soro antibotrópico-laquético (SABL) - utilizado no tratamento de acidentes com jararacas e surucucus.

Visto que quanto mais rapidamente for iniciado o tratamento, menores serão as sequelas ou mortalidade, para isso, seria interessante que os antivenenos fossem cuidadosamente disponibilizados com base na distribuição geográfica dos problemas (GUTIÉRREZ, 2012; HANSSON et al., 2013). Nesse sentido, o conhecimento a respeito dos padrões de distribuição de serpentes peçonhentas torna-se essencial para o tratamento antiofídico mais adequado dos acidentes possibilitando ações mais efetivas e específicas para cada situação.

Sabe-se, porém, que este tratamento possui várias limitações, como por exemplo, o risco de complicações provenientes da administração do soro (doença do soro) e a presença de componentes presentes na peçonha que, embora possuam uma baixa imunogenicidade, possuem uma alta toxicidade (fosfolipases A_2, por exemplo), não induzindo resposta imune em equinos, tornando o soro pouco eficaz para essas enzimas (SANTOS-FILHO, 2011).

1.4.1.1. Soroterapia

O tratamento especifico para acidentes ofídicos com serpentes do gênero *Bothrops* consiste na administração precoce do soro antibotrópico (SAB) e caso este não seja disponível, as associações antibotrópico-crotálico (SABC) ou antibotrópico-laquético (SABL) por via intravenosa, em ambiente hospitalar e sob supervisão médica, pois é necessário conhecer os efeitos clínicos dos venenos para utilizar o tipo correto e a quantidade adequada de soro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). É importante salientar os cuidados e tratamentos gerais com a vítima e os primeiros socorros necessários até a administração do tratamento antiofídico.

A confirmação laboratorial do acidente com serpentes do gênero *Bothrops* pode ser feita através de técnica de ELISA pela detecção de antígenos da peçonha botrópica no sangue ou em outros líquidos corporais do paciente. Exames importantes para o diagnóstico são os ensaios laboratoriais através de tempo de coagulação (TC) – que geralmente está aumentado, e o tempo parcial de tromboplastina (PTT). Estes exames também são utilizados Q a evolução clínica e a

conduta terapêutica. De acordo com a classificação do quadro do acidente botrópico, este pode ser classificado como leve, moderado ou grave, sendo esta classificação importante para a conduta terapêutica uma vez que determinará a quantidade de soro antiofídico necessária. Pinho e Pereira (2001) sumarisaram na a classificação quanto à gravidade e soroterapia para este tipo de acidente (Tabela 1). Segundo Filho (1997), o paciente deve ficar internado em hospital para controle clínico por pelo menos 72 horas após sofrer o acidente.

Tabela 1. Acidente bothrópico: Classificação quanto à gravidade e soroterapia recomendada segundo Pinho e Pereira (2001).

Manifestação e tratamento	Caso leve	Casos moderado	Caso grave
Locais: dor, edema e equimose	Ausentes ou discretas	Evidentes	Intensas
Sistêmicas: hemorragias choque e anúria	Ausentes	Ausentes	Presentes
Tempo de coagulação (TC)	Normal ou alterado	Normal ou alterado	Normal ou alterado
Soroterapia* SAB-SABC-SABL	2 a 4 ampolas	4 a 8 ampolas	12 ampolas
Via de administração	Endovenosa	Endovenosa	Endovenosa

(PINHO; PEREIRA, 2001)

1.4.1.2. Complementação da soroterapia

Embora o soro antiofídico seja eficiente contra os efeitos tóxicos de componentes presentes nas peçonhas de serpentes, como citado no item anterior, este tratamento possui várias limitações podendo inclusive haver risco de complicações.

Dessa forma, constantemente são buscados novos agentes neutralizantes para os efeitos tóxicos causados pelos componentes das peçonhas de serpentes, como por exemplo, os das PLA_2, responsáveis por diversos efeitos como os neurotóxicos, miotóxicos, edematogênicos, citotóxico, entre outros. As descobertas destes agentes neutralizantes em plantas, mamíferos e nas próprias serpentes

podem ser bastante úteis para estudos relacionados aos mecanismos de ação desses componentes tóxicos e essas moléculas virem a se tornar no futuro drogas ou complementos tanto na terapêutica antiofídica e de processos inflamatórios, relacionados ao metabolismo de fosfolipídeos de membranas, quanto de doenças como aterosclerose e doença de Alzheimer. Como exemplo relativamente recente do potencial terapêutico encontrado nos componentes das peçonhas ofídicas, pode ser citada a descoberta do fator potencializador da bradicinina (FPB), um inibidor da enzima conversora da angiotensina I (ECA I), cujo princípio ativo foi descoberto a partir do veneno da serpente *B. jararaca* (FERREIRA, 1965; KOH & KINI, 2012), sendo atualmente o fármaco mais vendido para tratamento da hipertensão arterial.

Assim, como já foi citado anteriormente, sabe-se da existência de diversos agentes neutralizantes dos efeitos das peçonhas de serpentes como os PLIs, inibidores de muitas ações tóxicas das $PLA_{2s,}$ que poderão no futuro também ser fármacos ou adjuvantes na complementação da soroterapia contra acidentes ofídicos contribuindo em demasia com a eficiência e qualidade dos tratamentos já utilizados. Ademais, a grande variedade de espécies e cada qual com proporções e características distintas de agentes tóxicos em suas peçonhas, proporciona um campo vasto para pesquisas de moléculas com potenciais efeitos farmacológicos e o conhecimento aprofundado destas moléculas neutralizantes e de seus mecanismos de ação pode contribuir também na terapia tornando-a mais especifica e mais eficaz.

Devido a todos os fatores apontados anteriormente, como gravidade do envenenamento causado principalmente pelas miotoxinas, a baixa imunogenicidade dessas moléculas e inespecificidade do soro antiofídico, o estudo do rBaltMIP como inibidor recombinante de PLA_2s do grupo II de serpentes torna-se importante devido às possíveis aplicações clínicas, podendo ser útil na indústria biotecnológica, em estudos de mecanismo de ação de peçonhas, designers de inibidores sintéticos e compreensão de outras características funcionais e estruturais das miotoxinas. Ainda, esses PLIs possuem grande potencial para complementar a soroterapia antiofídica atualmente utilizada uma vez que, são específicos para algumas PLA_{2s} tóxicas podendo assim, neutralizar melhor seus efeitos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O presente trabalho tem como objetivo a caracterização bioquímica e funcional de um alfa inibidor de miotoxinas proveniente da serpente *Bothrops alternatus*, em sua forma recombinante.

2.2. Específico

- ✓ Purificação da miotoxina Lys49 BthTX-I, e da PLA_2 Asp49 BthTX-II da peçonha de *B. jararacussu* ;
- ✓ Expressão heteróloga e purificação do alfa inibidor recombinante rBaltMIP em leveduras *Pichia pastoris*;
- ✓ Caracterização bioquímica do inibidor recombinante através do sequenciamento de peptídeos trípticos por espectrometria de massa; SDS-PAGE em condições desnaturantes e não desnaturantes; eletroforese em condições nativas; cálculo do conteúdo de glicosilação dessa proteína; cromatografia em resina de exclusão molecular na presença de padrões de peso molecular, para o cálculo da massa do rBaltMIP em solução e determinação do PI, por focalização isoelétrica.
- ✓ Avaliação da atividade edematogênica da miotoxina Lys49 BthTX-I e da PLA_2 Asp49 BthTX-II da peçonha de *B. jararacussu;*
- ✓ Cálculo da concentração edematogência efetiva (CE50) das toxinas BthTX-I e II;
- ✓ Inibição da atividade edematogênica das BthTX-I e II pelo inibidor rBaltMIP;
- ✓ Cálculo da concentração miotóxica efetiva (CE50) das toxinas BthTX-I e II;
- ✓ Inibição da atividade miotóxica das BthTX-I e II pelo inibidor rBaltMIP.
- ✓ Avaliação da atividade miotóxica da miotoxina Lys49 BthTX-I na presença do soro antiofídico;
- ✓ Avaliação do potencial imunogênico do rBaltMIP;
- ✓ Avaliação da possibilidade de complementação da soroterapia com o rBaltMIP.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Peçonhas

A peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* foi adquirida do serpentário Centro de Extração de Toxinas (CTA) (Morungaba – SP).

3.1.2. Animais

Para as atividades farmacológicas, foram utilizados camundongos machos da linhagem suíça, com peso entre 18-22g, os quais foram adquiridos do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto e mantidos no biotério de manutenção da FCFRP da Universidade de São Paulo, em sala com temperatura e ventilação controladas, recebendo água e ração. As peçonhas e toxinas foram administradas de forma subcutânea, intramuscular e intraplantar, dependendo do experimento a ser realizado, em seguida, o animal foi sacrificado no próprio biotério, por meio da utilização de dióxido de carbono.

O trabalho foi certificado por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto-USP tendo sido aprovado em reunião da CEUA de 07/10/2013 (Protocolo 13.1.276.53.1) (**Anexo 1**).

3.1.3. Soro antiofídico

O soro antiofídico polivalente de uso veterinário da marca Rasg & Aplik (lema bioLOGIC do Brasil Ltda) foi comprado e testado para a avaliação das propriedades inibitórias frente à miotoxina Lys49 BthTX-I e peçonha de *B. jararacussu* na presença e ausência do rBaltMIP na proporção molar 1:1 (rBaltMIP:BthTX-I).

3.1.4. Demais materiais

Todas as colunas e resinas cromatográficas empregadas no presente trabalho foram procedentes da Pharmacia Biotech. Ademais, no decorrer do texto, no item “métodos” foram citados os equipamentos e reagentes utilizados neste trabalho. Os reagentes utilizados são de grau analítico e provenientes da Sigma, Pharmacia, Merck, Synth e JT Baker.

3.2. Métodos

3.2.1. Isolamento das Miotoxinas

3.2.1.1. Cromatografia de exclusão molecular da peçonha de *Bothrops jararacussu*

A miotoxina bothropstoxina I (BthTX-I) e a fosfolipase A_2 bothropstoxina II (BthTX-II) de *B. jararacussu* foram isoladas segundo Cintra et al. (1993) com modificações. Amostras de 500 mg de peçonha bruta foram suspensas em 5 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 50 mM pH 8,0, centrifugadas em centrífuga EPPENDORF 5804 R a 10.000*xg* por 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante límpido aplicado à uma coluna de vidro contendo Sephadex G-75 (110 x 4,0 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição da amostra foi realizada com o mesmo tampão, em um fluxo de 30 mL/h. Frações de aproximadamente 10 mL/tubo foram coletadas por um coletor de frações da Pharmacia Biotech. As absorbâncias foram monitoradas por espectrofotômetro (BECKMAN DU 640) em comprimento de onda a 280 nm e o gráfico foi traçado, utilizando-se o programa Origin Pro 8, plotando-se a absorbância de cada fração no eixo das ordenadas e o número de cada tubo no eixo das abscissas. Os pools foram delimitados, reunidos e liofilizados. Após liofilização as amostras foram armazenadas a -20^{0}C e estocadas para uso.

3.2.1.2. Cromatografia de troca iônica

A partir da fração P4, obtida da cromatografia da peçonha bruta (item 3.2.1.1.), foram isoladas as miotoxinas bothropstoxinas I e II (BthTX-I e II) de *B.*

jararacussu. Amostras de 50 mg da fração P4 foram dissolvidas em 2,0 mL de AMBIC 50 mM pH 8,0, centrifugadas em centrífuga EPPENDORF 5804 R a 10.000*xg* por 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante límpido aplicado à uma coluna contendo CM-Sepharose (2,0 x 40 cm) acoplada a um sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*, *AKTAFPLC, GE Healthcare Life Science*) previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição da amostra foi realizada em um gradiente de concentração linear de AMBIC (0,05 a 0,5 M), em um fluxo de 1,5 mL/min. Frações de aproximadamente 4,0 mL/tubo foram coletadas. As frações foram monitoradas pela determinação da absorbância à 280 nm através de um detector do próprio sistema (*Akta Purifier, GE healthcare*). Os pools foram reunidos, liofilizados e armazenados a -20^{0}C para uso.

3.2.2. Determinação quantitativa de proteínas

Para quantificar as toxinas foi utilizado o método do microbiureto, conforme descrito por Itzhaki e Gill (1964) com soluções contendo de 0,1 a 2,0 mg de proteínas. A curva padrão foi construída utilizando-se soroalbumina bovina em diferentes concentrações.

As dosagens para os ensaios experimentais do rBaltMIP foram feitas utilizando-se o método descrito por Scopes (1974) e o aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) para a dosagem das amostras para os experimentos de deglicosilação.

3.2.3. Avaliação do grau de pureza

A avaliação do grau de pureza das frações obtidas nos diferentes procedimentos cromatográficos, das toxinas isoladas e do inibidor foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida a 13,5% e por HPLC em coluna de fase reversa C18. No experimento de imunogenicidade foi usado gel SDS-PAGE a 12%.

3.2.3.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

As análises eletroforéticas para avaliar o grau de pureza e as massas relativas das frações resultantes dos processos cromatográficos na obtenção das

toxinas quanto do inibidor recombinante foram realizadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970), com modificações conforme descrito a seguir. Os geis de resolução a 13,5% (m/v) em acrilamida (bis-acrilamida: acrilamida 1:19 (m/m)) foram preparados em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 8,8 e SDS 10%. Os geis de concentração a 5% em acrilamida foram preparados em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 10%. Amostras de proteína foram dissolvidas em tampão para amostras, Tris-HCl 0,5 M, pH 6,5 contendo azul de bromofenol (0,01%), SDS (2%) e glicerol (10%). Em cada gel foi utilizado padrão de massa molecular da Thermo (26610).

Após a corrida eletroforética feita a 100 V e 10 mA, o gel foi corado por 1h em azul de coomassie G-250 0,1% (p/v) dissolvido em água: metanol: ácido acético (40:50:10 v/v) e descorado em ácido acético glacial 10% (v/v), sendo em seguida, documentado em scanner.

As proteínas de referência do padrão da Thermo correspondem a: β-galactosidase (116,0 kDa), Albumina de soro bovino (66,2 kDa), Ovoalbumina (45,0 kDa), Lactato desidrogenase (35,0 kDa), REase Bsp98I (25,0 kDa), β-lactoglobulina (18,4 kDa) e lysozyme (14,4 kDa).

3.2.3.2. Cromatografia de fase reversa em HPLC

A fim de confirmar o grau de homogeneidade das toxinas, tanto a BthTX-I (1mg) quanto a BthTX-II (1mg) foram dissolvidas separadamente em 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) (solvente A). Cada solução foi clarificada por centrifugação a 10.000*xg* por 10 minutos em centrifuga EBA 12, e cada sobrenadante límpido aplicado separadamente em uma coluna C-18 de fase reversa (250 mm x 4,6 mm) em sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography, SHIMADZU)* previamente equilibrada com a mesma fase móvel. As proteínas foram eluidas com gradiente linear (0-100%) de 70% (v/v) de acetonitrila em 0,1% de ácido trifluoroacético (solvente B), a um fluxo de 1 mL/min. O perfil de eluição foi monitorado a 280nm pelo próprio aparelho e as frações recolhidas, liofilizadas e armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

3.2.4. Indução da expressão e purificação do inibidor recombinante

A indução da expressão e purificação do inibidor foi feita conforme descrito por Santos-Filho et al. (2011). Foram utilizados para a amplificação dos genes que codificam o αBaltMIP oligonucleotídeos específicos sem peptídeos sinal, contendo sítios de clivagem para as enzimas *Xho*I e Kex2 (senso) e *Sal*I (anti-senso). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados na subclonagem do gene codificante do αBaltMIP foram:

5´-CCGCTCGAGAAAAGACATGAACAAGATCCTGATGG -3´ (senso); e
5´-GCGTCGACTAAAATGAAATAAAACTCACACACGAC-3´ (anti-senso).

Os produtos das PCRs e o vetor de expressão para proteínas secretadas pPICZαA (Invitrogen) foram submetidos à digestão com as enzimas *Xho* I e *Sal* I e a ligação do vetor ao gene de αBaltMIP foi feita por meio de reação com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) por 5 h a 22°C. O plasmídeo recombinante pPICZaA-αBaltMIP foi transformado em células de *Escherichia coli* DH5α, $CaCl_2$ competentes em meio LB (1% triptona, 0,5% NaCl e 0,5% extrato de levedura) contendo 25 µg/mL de Zeocina (Invitrogen), as colônias obtidas foram submetidas à PCR de colônia. Em seguida foi feita mini-preparação (*miniprep*) (BIRNBOIM; DOLY, 1979), a amplificação e purificação dos plasmídeos por lise alcalina sendo confirmadas as corretas orientações dos insertos por sequenciamento automático utilizando o kit *ET Dye Terminator* e o equipamento *MEGA-BACE 1000 automated DNA sequencer* (GE Healthcare) (SANTOS-FILHO et al., 2011).

Neste trabalho foi feita a indução da expressão do rBaltMIP heterólogo seguindo descrição do manual *Easy Select Pichia Expression* (Invitrogen). As colônias foram individualmente inoculadas em pré-inóculo em pequena escala em 10 mL de meio BMGY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% YNB, 4x10-5 biotina, 1% glicerol, 100 mM fosfato de potássio pH 6,0) com presença de zeocina 5% e incubadas à 30°C sob agitação de 210 rpm. Após 24 horas, foi feita a geração de biomassa com a adição dos 10 mL de pré-inóçulo em 500 mL de meio BMGY nas mesmas proporções anteriormente descritas. Passadas mais 24 horas, as culturas foram centrifugadas a 1.500xg por 10 min em temperatura ambiente, o sobrenadante descartado e as células foram ressuspendidas por meio de agitação manual e suave e colocadas em 100 mL de meio BMMY (1% extrato de levedura, 2% peptona,

1,34% YNB, 4 x 10-5 % biotina, 1% metanol, 100 mM fosfato de potássio pH 6,0) para a indução da expressão, e então as culturas foram incubadas novamente nas mesmas condições descritas anteriormente. Para a manutenção da indução, realizou-se a reposição de metanol 100% em uma concentração final de 0,75% a cada 24 h. O meio da indução contendo a proteína expressa foi coletado no tempo de 72 h, centrifugado a 1.500xg e temperatura ambiente por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e filtrado com membranas de PVDF (polyvinylidene difluoride)(Millipore). Para a purificação do rBaltMIP, o sobrenadante de colônia foi submetido à uma coluna de Ni-Sepharose (Qiagen) em concentrações crescentes de imizadol (75-250 mM). Logo após, as frações eluídas da cromatografia de Ni-Sepharose foram analisadas por SDS-PAGE 13,5% e aquelas que mostraram bandas na posição de ~21 kDa (posição esperada para o inibidor expresso) foram submetidas a uma cromatografia de fase reversa em sistema de alta performance (HPLC) para a analisar a pureza da proteína recombinante, em seguida foram liofilizadas e estocadas à temperatura de -20^{0}C até o momento do uso.

Os experimentos de indução da expressão e da purificação do alfa inibidor recombinante rBaltMIP em leveduras *Pichia pastoris* foram desenvolvidos no Laboratório de Toxinas Animais de responsabilidade da Profa. Dra. Eliane Candiane Arantes com a colaboração da pós-doutoranda Johara Boldrini-França.

3.2.5. Caracterização Bioquímica do rBaltMIP

3.2.5.1. Determinação da massa molecular

A massa molecular do inibidor recombinante foi determinada por SDS-PAGE 13,5%, espectrometria de massas com ionização e dessorção a laser assistida por matriz com analisador por tempo de vôo (MALDI/TOF/TOF MS) e a Mr do oligômero por cromatografia de gel filtração com padrões de calibração.

3.2.5.1.1. Determinação da massa molecular de rBaltMIP em solução

A massa molecular do rBaltMIP foi determinada por cromatografia de gel filtração em sistema FPLC (AKTA Fast Protein Liquid Chromatography, GE Healthcare) sob condições não desnaturantes em coluna Superdex 200 10/ 300 GL utilizando kit de padrões de calibração Bio-Rad®. Foi usado como fase móvel

bicarbonato de amônio 0,05 M, com fluxo de 1 mL/min. A massa molecular do rBaltMIP foi estimada baseando-se nos padrões da curva de calibração: Thyroglobulina (bovina) 670,000; γ-globulina (bovina) 158,000; Ovalbumina (galinha) 44,000; Mioglobina (cavalo) 17,000 e Vitamina B12). O coeficiente de partição (K_{av}) foi determinado pela equação: $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, em que V_e = volume de eluição, V_0 = volume morto e V_t = volume total da coluna. A análise de regressão linear foi feita com a utilização do programa Origin Pro 8.

3.2.5.1.2. SDS-PAGE a 13,5%

A eletroforese do rBaltMIP foi realizada conforme descrito no item 3.2.3.1. A massa molecular relativa do monômero do rBaltMIP foi estimada pela interpolação da sua migração relativa no gel em uma curva linear logarítmica da massa molecular das proteínas do padrão molecular versus a distância de migração relativa de cada proteína no gel.

3.2.5.1.3. MALDI/TOF/TOF MS

A massa molecular do monômero do rBaltMIP foi determinada em espectrômetro de massas com ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) tipo duplo TOF (*Time of flight*) (MALDI/TOF/TOF MS, modelo AXIMA PERFORMANCE, Shimadzu Biotech – Launchpad 2.8.3 software; Kratos-Shimadzu, Manchester, UK).

Para a determinação de massa intacta da proteína, a matriz ácido sinapínico (10 mg/mL em 50% de acetonitrila /0,1% TFA), foi adicionada à amostra na razão 1:1. Os espectros MS foram obtidos no modo LINEAR Positivo, e os íons detectados tiveram suas massas determinadas em relação a um padrão de calibração (Protein MALDI-MS Calibration Kit; Sigma, MSCAL-1-1KT, 057k6815) contendo as seguintes proteínas: Insulina (bovina), Citocromo C (equino), Aldolase (coelho), BSA (soro albumina bovina). A faixa de massas moleculares avaliada foi de 3.000 – 100.000 m/z.

Esta determinação foi realizada no Centro de Química de Proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto, em colaboração com o Professor José Cesar Rosa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.2.5.2. Determinação do conteúdo de carboidratos do rBaltMIP

O conteúdo de carboidratos presentes no rBaltMIP foi determinado através da diferença entre a massa molecular intacta do inibidor recombinante e a massa molecular do inibidor recombinante na forma deglicosilada.

3.2.5.2.1. Deglicosilação do rBaltMIP (D-rBaltMIP)

O rBaltMIP foi deglicosilado usando PNGase F(New England BiLabs), 500,000 U/mL. Foram utilizados 292 μg/24 μL do rBaltMIP (concentração determinada através do NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). A esta solução foram adicionados 4 μL de tampão desnaturante e em seguida, a solução foi aquecida à 100°C por 20 minutos. Findo este tempo, 2 μL de tampão de reação G7 (10X), 2 μL de NP-40 (10%) e 2 μL de PNGase F, foram acrescentados à solução e deixada em Banho-Maria à 37^{0}C por 24 horas.

3.2.5.2.2. Determinação da massa molecular relativa do rBaltMIP Deglicosilado (D-rBaltMIP) por SDS-PAGE

O conteúdo proteico, deglicosilado (D-rBaltMIP) e não deglicosilado (G-rBaltMIP) foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 13,5% em condições desnaturantes com dodecil sulfato de sódio. Foram utilizados 10 μg de D-rBaltMIP e 10 μg de G-rBaltMIP na eletroforese em SDS-PAGE desenvolvida de acordo com Laemmli (1970) (item 3.2.3.1). As amostras de proteínas foram preparadas na presença ou ausência de tampão desnaturante contendo β-mercaptoetanol que foi adicionado ao tampão de amostra a 3,5%. Em cada gel foi utilizado padrão de massa molecular da Thermo (26610).

3.2.5.2.3. Determinação da massa molecular do rBaltMIP Deglicosilado (D-rBaltMIP) por MALD/TOF/TOF MS

A massa molecular do inibidor recombinante deglicosilado (D-rBaltMIP) foi determinada por espectrometria de massas com ionização e dessorção a laser assistida por matriz com analisador por tempo de vôo (MALDI/TOF/TOF MS) conforme descrito no item 3.2.5.1.3.

3.2.5.3. Determinação do Ponto Isoelétrico do inibidor recombinante rBaltMIP

A focalização isoelétrica do rBaltMIP foi realizada segundo método descrito por Vesterberg (1972), com pequenas modificações. O gel foi preparado a 7% (m/v) em poliacrilamida (bis-acrilamida: acrilamida 0,8:30), contendo 10% (m/v) de sacarose, 1% (v/v) de anfólito pH 3,0-10,0 (*Pharmacia Biotech*), 0,17% (v/v) de TEMED (Tetrametiletilenodiamina) e 0,075% (m/v) de persulfato de amônio. A polimerização do gel foi realizada em placa de vidro de 12 x 14 cm com espessura de 0,14 cm. Em seguida, o gel foi colocado sobre uma placa de porcelana refrigerada (umedecida com glicerol) ligada a um banho a temperatura de 4°C. Duas tiras de papel (*Pharmacia Biotech*) foram utilizadas para conectar o gel e os eletrodos de platina, sendo o cátodo embebido em uma solução de NaOH 1 M e o ânodo em ácido fosfórico 1 M. Os eletrodos de platina foram centralizados sobre as tiras de papel e o sistema foi então fechado. A fonte de alta voltagem foi ajustada para valores de 500 V, 10 mA e 3 Watts para a realização de uma pré-focalização por 30 minutos. Em seguida, 10 µL da amostra rBaltMIP foram aplicados no centro do gel e a focalização prosseguiu por 5 horas à 1500 V, 15 mA e 10 Watts. Padrões de pI (ficocianina pI 4,45; 4,65 e 4,75; β lactoglobulina B pI 5,1; anydrase carbônica bovina pI 6; anidrase carbônica humana pI 6,4; mioglobulina equina pI 6,8 e 7,0; hemoglobina A pI 7,1; hemoglobina C pI 7,5; lentil lectina pI 7,8, 8,0 e 8,2 e citocromo C pI 9,6)(BIO-RAD) foram corridos em paralelo à amostra nas mesmas condições.

Após a focalização isoelétrica, desprezou-se 0,5 cm das laterais do gel e tiras de 1,0 x 2,0 cm foram seccionadas do mesmo, sendo colocadas em tubo de ensaio contendo 0,5 mL de água destilada para leitura do pH após 2 horas em repouso. Estas tiras foram cortadas nas laterais do gel intercaladamente, de forma a obter valores de pH para cada 0,5 cm do gel. O restante do gel contendo a amostra foi fixado em solução de ácido tricloroacético a 10% (m/v) por 30 minutos e corado por *Coomassie Brilliant Blue*.

3.2.6. Caracterização Estrutural do rBaltMIP

3.2.6.1. Dedução das sequências dos peptídeos trípticos

3.2.6.1.1. Hidrólise tripsínica *in situ*

À amostra do rBaltMIP foi adicionado solução de tripsina a 0,5 µg/20 µL de bicarbonato de amônio 0,1 M sendo incubado a 37°C por 24 horas. A reação foi interrompida pela adição de 5 µL de ácido fórmico e mantida em temperatura ambiente para a extração dos peptídeos. O material foi conservado em *freezer* (-20°C) até o momento da análise por espectrometria de massas.

Os peptídeos trípticos das amostras foram dessalificados em uma micro coluna de fase reversa (POROS R2, Perseptive Biosystems, EUA) previamente ativada com metanol e equilibrada com ácido fórmico a 0,2%. As amostras foram carregadas na coluna e purificadas de sais e outros componentes hidrofílicos por 3 lavagens com 100 µL de ácido fórmico a 0,2%, sendo os peptídeos eluídos da resina com 30 µL de uma solução de metanol 60% em ácido fórmico 5%. As amostras foram secas em centrífuga rotatória a vácuo para que pudessem ser diluídas em matriz apropriada para análise por ESI Q-TOF.

3.2.6.1.2. ESI Q-TOF

A amostra após ser dessalificada e seca foi diluída em volume apropriado (20 µL) de ácido fórmico 0,1% com acetonitrila a 5% e submetida à separação por UPLC (Waters, Beverly, MA) com uma coluna capilar de fase reversa C_{18}, acoplado diretamente à fonte de ionização. Os solventes foram A= AcN 5% em ácido fórmico 0,1% e solvente B= AcN 95% em ácido fórmico 0,1%, com fluxo de 200-400 nL/min, com um gradiente linear crescente de solvente B. Os peptídeos foram analisados “online” em uma fonte “electrospray” acoplado a um espectrômetro de massas Q-TOF (ESI-Q-TOF-MS, Ultima, Waters). Para isto utilizou-se uma voltagem de 3,5 kV para a fonte de ionização, um “cone voltage” de 40 V, e a temperatura da fonte de 100ºC. Os espectros foram coletados no modo “data–dependente-acquisition”, e processados pelo programa Mass Lynx 4.0. Os peptídeos fragmentados por colisão induzida (CID-MS/MS) foram coletados automaticamente, sendo selecionados pelos

íons mais intensos durante um determinado tempo da cromatografia, utilizando para isto programas apropriados.

3.2.6.1.3. Identificação dos peptídeos obtidos utilizando o software MASCOT

Os espectros obtidos foram processados e submetidos a um banco de dados para identificação das proteínas, utilizando o programa Mascot versão 2.4.1 e o banco de dados NCBi, sem taxonomia tendo como parâmetros: enzima tripsina com perda de 1 clivagem ("missedcleavage"), e modificações variáveis para oxidação de Metionina. Para excluir as identificações falso-positivas (FDR) os espectros de massas foram submetidos ao banco de dados no modo reverso, nível de significância estatística de $p<0,05$ que corresponde a um erro permitido de 5%, um "score" para peptídeos >35.

Estes experimentos foram realizados no Centro de Química de Proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto em colaboração com o Prof. Dr. José César Rosa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.2.6.1.4. Análise *in silico* e do grau de homologia do inibidor

As sequências obtidas dos peptídeos trípticos foram submetidas a alinhamento múltiplo com outras sequências de moléculas homólogas depositadas nos principais bancos de dados utilizando os programas FASTA (www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/index.html) e BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Os alinhamentos foram realizados no programa Clustal X (versão 2.02).

3.2.7. Caracterização Funcional das toxinas BthTX-I e BthTX-II

3.2.7.1. Atividade Fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi realizada em placas de petri, conforme descrito por Gutiérrez et al. (1988), com modificações, como a troca da agarose por Agar e assim a solidificação do meio. O experimento consistiu na elaboração de um gel contendo $CaCl_2$ a 0,01 M, gema de ovo 1:3 (v/v), PBS pH 7,2, ágar bacteriológico a

1% e azida de sódio a 0,005%, sendo o volume final de 30 mL completado com PBS. Após a solidificação do gel foram feitos orifícios de tamanho uniforme (0,5 cm de diâmetro) e aplicadas as amostras diluídas em PBS, em volume final de 20 µL. A atividade fosfolipásica da PLA_2 Lys49 BthTX-II foi avaliada através de prévia incubação da enzima em diferentes concentrações (0,25 e 0,5 µg/µL) Os géis contendo as amostras foram mantidos em estufa à temperatuda 37ºC por 12 horas. A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel é um indicativo de atividade, onde os halos foram medidos em milímetros para a quantificação da atividade fosfolipásica. A atividade foi determinada como a quantidade de amostra (µg) responsável pela formação de um halo de 20 mm.

3.2.7.2. Atividade Miotóxica

Camundongos machos Swiss (18 a 22g) foram separados em grupos de 06 e receberam uma injeção no músculo gastrocnêmio direito, de concentrações das diferentes toxinas e/ou inibidor (rBaltMIP), solubilizadas em 50 µL de PBS. Os controles receberam somente PBS (Grupo 1 - G1). Nestes experimentos foram utilizadas seringas para insulina (BD Ultra-Fine II – 8 mm x 0,3 mm).

Para a obtenção dos plasmas dos camundongos, após três horas da injeção, os animais foram anestesiados com 20 µL de solução de xilamina/ketamina (1:1) e em seguida 150 µL de sangue foram coletados dos camundongos por punção cardíaca utilizando seringas de 1 mL (BD) e agulhas de 0,45 x 13 mm (BD) sendo transferidos imediatamente para eppendorfs contento 15 µL de EDTA 10% e em seguida, os animais foram eutanasiados. O sangue coletado de cada animal foi centrifugado à 2.500*xg* por 8 minutos à temperatura ambiente em centrifuga EBA 12 e uma alíquota de 20 µL do plasma foi separada, colocada em eppendorf para utilização na dosagem de CK. Todos os experimentos de miotoxicidade foram realizados em triplicata independentes.

A atividade da enzima creatina cinase (CK) foi determinada utilizando-se 20 µL de plasma com 1,0 mL de reativo preparado conforme especificação do Kit_UV K010 (Bioclin) cinético. O reativo foi inicialmente deixado em banho-maria à 37ºC por aproximadamente 1 minuto e em seguida foi adicionado 20 µL de plasma, sendo estes colocados em cubeta termostatizada à 37 ºC já no espectrofotômetro (BECKMAN DU 640) e incubados por 2 minutos. A partir de então, foram feitas

leituras nos tempos: 0; 1; 2 e 3 minutos em 340 nm e a concentração de CK foi calculada através da equação: $CK(U/L)_{340nm} = \Delta A/min \times 8095$.

A atividade creatina cinase foi expressa em unidades/litro, sendo que uma unidade consiste no resultado da fosforilação de um nanomol (nmoL) de creatina por minuto (kit da BIOCLIN).

3.2.7.2.1. Determinação das CE50 da BthTX-I e BthTX-II para miotoxicidade

As concentrações efetivas (CE50) para indução de miotoxicidade após 3 horas da injeção das toxinas foram avaliadas através de curva Dose X resposta.

Para os experimentos de indução da atividade miotóxica das toxinas, camundongos machos *Swiss* (18-22g) foram divididos em seis grupos para BthTX-I (n=6) (G1 – G6) e 7 grupos para BthTX-II (G1 – G7). O grupo controle (G1) recebeu injeção no músculo gastrocnêmio de 50 µL de PBS, e o restante recebeu diferentes concentrações de toxina (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 µg/µL solubilizadas em 50 µL de PBS, sendo esta última concentração usada apenas para a BthTX-II. Após 3 horas foram colhidas amostras de sangue por punção cardíaca e determinada a atividade de CK plasmática conforme descrito no item 3.2.7.2.

O gráfico CK (U/L) x [toxina] foi determinado pelo programa GraphPad PRISM 5. Foram feitos três (3) experimentos independentes, em triplicata para cada concentração das miotoxinas (BthTX-I e BthTX-II) e em seguida foram determinadas suas concentrações efetivas (CE50).

3.2.7.3. Atividade edematogênica

Para os experimentos de indução da atividade edematogênica, camundongos machos *Swiss* (18-22 g) tiveram suas patas direitas medidas com paquímetro de baixa pressão (Mitutoyo) e em seguida receberam injeção subplantar de 50 µL de PBS – grupo controle (G1), os outros grupos receberam as diferentes concentrações das toxinas solubilizadas em 50 µL de PBS. Após 30 minutos o tamanho da pata foi medido com um paquímetro de baixa pressão. A porcentagem de edema foi calculada através da diferença de aumento da pata (após 30 min.) em relação ao tamanho da pata inicial (antes da injeção). Foram feitos três (3)

experimentos independentes, em triplicata para cada concentração das toxinas (BthTX-I e BthTX-II).

3.2.7.3.1. Determinação das CE50 da BthTX-I e BthTX-II para edema

As concentrações efetivas (CE50) para indução de edema após 30 minutos da injeção das toxinas foram avaliadas através de curva Dose X resposta.

Para os experimentos de indução da atividade edematogênica camundongos machos *Swiss* (18-22g) foram divididos em dez grupos (N=5) sendo um grupo controle que recebeu injeção subplantar de 50 µL de PBS, e o restante recebeu diferentes concentrações de toxina (0,0078; 0,0156; 0,0312; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 µg/µL). Após 30 minutos o tamanho da pata foi medido com um paquímetro de baixa pressão (Mitutoyo). A porcentagem de edema foi calculada através da diferença de tamanho da pata (após 30 min.) em relação ao tamanho da pata inicial (antes da injeção). O gráfico foi determinado pelo programa GraphPad PRISM 5. Foram feitos três (3) experimentos independentes, em triplicata para cada concentração das toxinas (BthTX-I e BthTX-II) e em seguida foram determinadas suas concentrações efetivas (CE50).

3.2.8. Caracterização Funcional do rBaltMIP

3.2.8.1. Neutralização da atividade miotóxica das toxinas BthTX-I e BthTX-II pelo inibidor rBaltMIP

Os experimentos de inibição da atividade miotóxica foram realizados em camundongos machos *Swiss* (18-22 g). As razões molares entre toxina/inibidor utilizadas foram calculadas através da CE50 obtida para cada toxina, sendo utilizadas duas vezes a concentração efetiva encontrada para cada toxina (2 x CE50). As razões molares utilizadas foram de 1:1 e 1:2 (toxina/inibidor) com incubação prévia por 30 min. a 37 ºC, antes da administração nos animais. Os camundongos foram divididos em cinco grupos (G1-G5) com n=6. O grupo controle (G1) recebeu injeção no músculo gastrocnêmico de 50 µL de PBS; o grupo (G2) recebeu solução de 50 µL com toxina; um grupo (G5) recebeu solução de 50 µL com somente o inibidor e o restante recebeu toxina + inibidor nas razões molares de 1:1 (G3) e 1:2 (G4), previamente incubadas por 30 min. a 37 º C. Após 3 horas foram

colhidas amostras de sangue por punção cardíaca e medida a CK plasmática conforme descrito no item 3.2.7.2. O gráfico CK(U/L) x [toxina] foi determinado pelo programa GraphPad PRISM 5.

Foram realizados três (3) experimentos independentes, em triplicata para cada concentração das toxinas (BthTX-I e BthTX-II) e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (SD). A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste ANOVA por análise de variância *One-way* - *Tukey*, com valor $p < 0,05$, considerado como significante.

3.2.8.2. Neutralização da atividade edematogênica das toxinas BthTX-I e BthTX-II pelo inibidor rBaltMIP

Os experimentos de inibição da atividade edematogênica foram realizados em camundongos machos *Swiss* (18-22 g) e as razões molares de toxina/inibidor utilizadas foram calculadas através da CE50 obtida para cada toxina, sendo utilizadas duas vezes a concentração efetiva encontrada para cada toxina (2 x CE50). As razões molares utilizadas foram de 1:1 e 1:2 (toxina/inibidor) com incubação prévia por 30 min. à 37 ºC, antes da administração nos animais. Os camundongos foram divididos em cinco grupos (G1-G5) com n=5, sendo que o grupo controle (G1) recebeu injeção subplantar de 50 µL de PBS; um grupo (G2) recebeu solução de 50 µL com toxina; um grupo (G5) recebeu solução de 50 µL com somente o inibidor e o restante recebeu toxina + inibidor nas razões molares de 1:2 (G3) e 1:7 (G4), previamente incubadas por 30 min. à 37 º C. Após 30 minutos da injeção a pata foi novamente medida e calculada a porcentagem de edema formado conforme descrito no item 3.2.7.3. O gráfico % de edema x [toxina] foi determinado pelo programa GraphPad PRISM 5.

Foram realizados três (3) experimentos independentes, em triplicata para cada concentração das toxinas (BthTX-I e BthTX-II) e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (SD). A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste ANOVA por análise de variância *One-way* - *Tukey*, com valor $p < 0,05$, considerado como significante.

3.2.9. Caracterização do potencial imunogênico do rBaltMIP

3.2.9.1. Imunização de animais e obtenção de anticorpos policlonais anti-rBaltMIP em soro.

Para o antígeno rBaltMIP foram imunizados 3 camundongos machos da linhagem BALB/c pesando de 18-23 gramas, seguindo o protocolo descrito a seguir. Inicialmente, antes do desafio com os diferentes antígenos, os animais foram devidamente anestesiados e coletou-se uma amostra de 200 μL de sangue por punção do plexo-orbital, para obtenção de soros pré-imunes. Esses soros foram utilizados como controles negativos na análise, por ELISA, da eficiência do procedimento de imunização.

Em seguida, procedeu-se a imunização dos camundongos com 10 µg do antígeno, o inibidor recombinante purificado, diluído em 150 µL de PBS estéril e emulsificado com 150 µL de adjuvante completo de Freund (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA), por via intraperitoneal. Após quinze dias, foi feita uma segunda imunização com 10 µg do rBaltMIP emulsificado com adjuvante incompleto de Freund, via intraperitoneal nos mesmos animais. Posteriormente, após mais 15 dias, foi coletada uma amostra de 200 μL sangue por punção do plexo-orbital e realizada nova imunização intraperitonealmente. Passados 15 dias após a última imunização, os camundongos foram anestesiados para coleta total de sangue por punção cardíaca. Os soros foram separados do coágulo por centrifugação a 1500xg, por 10 minutos, aliquotados e armazenados à –20°C. Posteriormente, as frações foram analisadas por ELISA e *Western Blotting*.

3.2.9.2. Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP em soros de camundongos imunizados por ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

A avaliação da Resposta Imune Humoral foi monitorada por titulação dos anticorpos policlonais por ELISA. Para tanto, placas de microtitulação de poliestireno, com 96 poços, foram sensibilizadas com o rBaltMIP, 1 µg em 50 µL de PBS por poço, “overnight”, a 4ºC. Sequencialmente, bloqueiou-se a placa com solução tampão de fosfato (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4 e 1,4 mM KH_2PO_4 com gelatina 3% (Amresco, Ohio, USA), 200 µL/poço, por 2h a 37ºC. Foram, então, repetidas as etapas de lavagem com solução tampão de fosfato (137

mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4 e 1,4 mM KH_2PO_4, gelatina 1% (Amresco, Ohio, USA) e surfactante Tween20 0,05% (Acros Organic, Bélgica). Os poços contendo as amostras dos anticorpos diluídos 1:1000; 1:2000; 1:4000 e 1:8000 em solução tampão de fosfato (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4 e 1,4 mM KH_2PO_4, gelatina 1% (Amresco, Ohio, USA) e surfactante Tween20 0,05% (Acros Organic, Bélgica). foram incubados por 1 hora a 37ºC, com 50 µL de amostra por poço, em duplicata, para determinar uma curva de titulação dos soros contendo anticorpos policlonais anti-rBalMIP.

Foi utilizado como anticorpo secundário, anticorpo de coelho anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase (HRPO: Horseradish Peroxidase Conjugated - Jackson ImmunoReseach- USA) diluído na proporção de 1:5000 (v/v) em solução tampão de fosfato (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4 e 1,4 mM KH_2PO_4 gelatina 1% (Amresco, Ohio, USA) e surfactante Tween20 0,05% (Acros Organic, Bélgica) e incubado por 1 hora. Após nova etapa de lavagem como as anteriores, a placa foi revelada. A solução reveladora para peroxidase foi o TMB (tetrametilbenzidina, Organon Teknika, Boxtel, NL) na presença de peróxido de hidrogênio. Após 10 minutos de incubação da solução reveladora, esta reação foi parada por adição de 50 µL por poço de solução de ácido sulfúrico 2 N. Foram feitas, então, leituras de absorbância em 450 nm em espectrofotômetro (Spectramax Plus – Molecular Devices). Os controles aplicados foram:

1) **Controle da proteína bloqueadora:** poços contendo todos os reagentes, com exceção dos antígenos, para avaliação da eficiência da proteína bloqueadora quanto a não reatividade com os anticorpos primários e/ou secundários;
2) **Controle do anticorpo secundário (anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo conjugado a peroxidase):** poços contendo todos os reagentes, com exceção do anticorpo primário (imunoglobulina de camundongo), para avaliação da eficiência do anticorpo secundário em reagir exclusivamente com o primário;
3) **Controle Negativo**: poços onde a solução de anticorpo primário foi substituída por soro total de camundongo antes da imunização com a rBaltMIP, na diluição de 1:1000 à 1:8000 (v/v).

3.2.9.3. Avaliação da especificidade do rBaltMIP com a BthTX-I

Alternativamente, para testar se os soros contendo anticorpos anti-inibidor reconheceriam a toxina, o mesmo ensaio de ELISA do item 3.2.9.2. foi realizado, utilizando-se a toxina na sensibilização da placa.

Por fim, foi feito um ensaio de ELISA usando-se a toxina ou BSA como *coating,* seguida de uma incubação de inibidor (na concentração de 20 µg/mL em solução tampão de fosfato (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4 e 1,4 mM KH_2PO_4 gelatina 1% (Amresco, Ohio, USA) e surfactante Tween20 0,05% (Acros Organic, Bélgica) por 1 hora a 37ºC, e os anticorpos primários e secundários, conforme descrito anteriormente.

Esse ensaio foi planejado para tentar detectar se o inibidor se liga especificamente à toxina utilizando-se os anticorpos policlonais anti-inibidor, produzidos por imunização.

3.2.9.4. Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP em soros de camundongos imunizados por *Western Blotting*

Amostras de rBaltMIP e da miotoxina BthTX-I foram submetidas a SDS-PAGE, em condições redutoras, realizada em mini-gel de poliacrilamida em concentração de 15% utilizando tampão convencional de corrida, contendo 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 190 mM Glicina e 25 mM Tris (Sigma Chemical Co, USA) pH 8,3, com 40 mA por cerca de uma hora. Em cada poço do mini-gel foram aplicadas 5 µg das proteínas, num total de 2 poços para cada uma delas, além de padrão de peso molecular para proteínas convencional (*Amersham Low Molecular Weight, GE Healthcare*) e biotinilado (*Biotinylated Protein Ladder Detection Pack #7727, Cell Signalling Technology, Inc*.) para posterior detecção no filme fotográfico.

As proteínas foram, então, eletrotransferidas do gel para membrana de PVDF (0,22 µm; *Hybond – Amersham Biosciences*, Alemanha) após ativação com metanol por 1,5 h e 300 mA em tampão 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 190 mM Glicina e 25 mM Tris (Sigma Chemical Co, USA) pH 8,3, contendo 10% metanol. A eficiência da eletrotransferência foi avaliada pela coloração da membrana com o corante *Ponceau S* para proteínas. A etapa de bloqueio foi realizada pela incubação da membrana com solução de TBS (*Tris buffer solution*) Tween 20 a 0,05%

contendo 5% de leite bovino em pó desnatado, por 1 hora sob branda agitação, a 4^0C.

Sequencialmente, a membrana foi cortada ao meio (duas contendo Toxina, inibidor e os padrões de peso molecular), e incubadas em câmara úmida com duas amostras diferentes de anticorpos:

- **Teste**: soro total dos animais imunizados contra rBaltMIP na diluição 1:8000 (v/v) em PBS contendoTween 20 a 0,05% leite bovino desnatado 5%;

- **Controle negativo:** os soros pré-imunes, ou seja, antes da imunização contra rBaltMIP na diluição 1:8000 (v/v) em PBS contendo Tween 20 0,05% leite bovino desnatado 5%;

- **Teste**: soro total dos animais imunizados contra rBaltMIP na diluição 1:8000 (v/v) em tampão 10 mM Tris, 100 mM NaCl, Tween 20 0,05% pH 8,0 e 5 % de leite bovino desnatado em pó;

- **Controle negativo:** os soros pré-imunes, ou seja, antes da imunização contra rBaltMIP na diluição 1:8000 (v/v) em em tampão 10 mM Tris, 100 mM NaCl Tween 20 0,05% pH 8,0 e 5 % de leite bovino desnatado em pó;

A incubação se deu por 12 horas (*overnight*) a 4ºC, sob leve agitação. Em seguida, as membranas foram submetidas a três lavagens com TBS-Tween 20 a 0,05% por 10 minutos cada, sob agitação. Após as etapas de lavagens, incubaram-se as membranas com anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (HRPO: *Horseradish Peroxidase Conjugated - Jackson ImmunoReseach-USA*), diluído na proporção de 1:10000 (v/v) em em tampão 10 mM Tris, 100 mM NaCl Tween20 0,05% pH 8,0 e 5 % de leite bovino desnatado em pó. As três etapas de lavagens foram repetidas. A imunorreatividade para o rBaltMIP foi detectada usando-se luminol, com a solução *Luminata™ Forte Western Blotting HRP Substrate* (Millipore™) e filme fotográfico (*Amersham Hyperfilm ECL™* – GE Healthcare, Alemanha).

3.2.9.5. Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP em soros de camundongos em experimento de miotoxicidade.

Foi avaliada a produção de anticorpos contra o inibidor recombinante em experimento de inibição da miotoxicidade (item 3.2.8.1.) da toxina BthTX-I pelo inibidor rBaltMIP na concentração molar 1:1. Foram utilizados quatro grupos de camundongos Balb/c (n=4) de 18-22 g, o grupo controle (G1) recebeu injeção no

músculo gastrocnêmico de 50 µL de PBS; o grupo G2 recebeu solução de 50 µL com toxina; um grupo (G4) recebeu solução de 50 µL com somente o inibidor e um grupo (G3) recebeu toxina + inibidor na razão molar de 1:1 previamente incubadas por 30 min. à 37º C. Passados 15 dias os camundongos foram anestesiados para coleta total de sangue por punção cardíaca. Os soros foram separados do coágulo por centrifugação a 1500xg, por 10 minutos, aliquotados e armazenados à –20°C e as frações foram analisadas por ELISA, na diluição 1:4000, para verificar a potencial imunogenicidade do inibidor rBaltMIP quando injetado simultaneamente com a BthTX-I.

Os experimentos de caracterização do potencial imunogênico do rBaltMIP foram realizados no Laboratório de Glicobiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em colaboração com o Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi e da Dra. Thalita Riul.

3.2.10. Ensaios de miotoxicidade da peçonha de *B. jararacussu* e da toxina BthTX-I com soro antiofídico e rBaltMIP

3.2.10.1. Neutralização da miotoxicidade pelo soro antiofídico e rBaltMIP com incubação prévia de 30 min.

Foi avaliada a neutralização da atividade miotóxica da peçonha bruta de *B. jararacussu e* da BthTX-I pelo soro antiofídico (SA) veterinário comercial (Rasg & Aplik) complementado (rBaltMIP + SA) ou não com o rBaltMIP (Tabela.1).

A atividade miotóxica foi realizada pela medida dos níveis de creatina cinase (CK) no plasma de camundongos. Em grupos de 6 camundongos machos *Swiss* (18-22g) foram injetados nos músculos gastrocnêmios soluções com volume final de 50 µL das diferentes substâncias diluídas em PBS previamente preparadas conforme segue:

(G1) solução contendo 50 µg da toxina BthTX-I dissolvida em 50 µL de PBS;

(G2) solução contendo 50 µg da toxina BthTX-I dissolvida em 25 µL de PBS incubada juntamente com o rBaltMIP na mesma razão molar, dissolvido em 25 µL de PBS;

(G3) solução contendo 50 µg da toxina BthTX-I dissolvida em 25 µL de PBS incubada juntamente com o SA na mesma razão molar, dissolvido em 25 µL de PBS;

(G4) solução contendo 50 µg da toxina BthTX-I dissolvida em 25 µL de PBS incubada juntamente com o SA complementado (misturado) com o rBaltMIP, nas mesmas razões molares, dissolvidos em 25 µL de PBS;

(G5) solução contendo 50 µg da peçonha bruta (PB) dissolvida em 50 µL de PBS;

(G6) solução contendo 50 µg da PB dissolvida em 25 µL de PBS incubada juntamente com o rBaltMIP na mesma razão molar, dissolvido em 25 µL de PBS;

(G7) solução contendo 50 µg da PB dissolvida em 25 µL de PBS incubada juntamente com o SA na mesma razão molar, dissolvido em 25 µL de PBS;

(G8) solução contendo 50 µg da PB dissolvida em 25 µL de PBS incubada juntamente com o SA complementado (misturado) com o rBaltMIP, nas mesmas razões molares, dissolvidos em 25 µL de PBS;

(G9) solução contendo 50 µL de PBS sozinho;

Todas as soluções, exceto as referentes aos grupos 1, 5 e 9, foram preparadas isoladamente e em seguida as soluções de cada grupo foram misturadas e incubadas por 30 min à temperatura de 37^0C, conforme descrito acima e esquematizado na Tabela 2(A). Após este tempo foram feitas as aplicações das soluções nos respectivos grupos de animais com seringas para insulina (BD Ultra-Fine II – 8 mm x 0,3 mm).

Após 3 horas das aplicações, os sangues dos animais foram coletados e seus plasmas separados conforme procedimento descrito no item 3.2.7.2.

Tabela 2(A). Esquema de avaliação da neutralização da atividade miotóxica do soro antiofídico comercial complementado ou não com o rBaltMIP com prévia incubação de 30 minutos.

	G1	G2	G3	G4	*G5*	G6	G7	G8	G9
Controle	+								
+					+				
rBaltMIP		+				+			
SA			+				+		
rBaltMIP + SA				+				+	
PBS									+
	BthTX-I				**Peçonha**				

Onde: SA = soro antiofídico

3.2.10.2. Neutralização da miotoxicidade pelo soro antiofídico e rBaltMIP sem incubação prévia de 30 min.

Para analisar a real possibilidade de utilização de inibidores plasmáticos ou de proteínas recombinantes derivadas de inibidores plasmáticos de serpentes como terapêutica no tratamento de envenenamentos, foi realizado o teste de inibição da atividade miotóxica da PLA_2s-símile Lys49 e da peçonha bruta de *B. jararacussu* (PB) o inibidor e/ou soro antiofídico comercial sem a prévia incubação de 30 minutos à temperatura de 37^0C anteriormente à aplicação das soluções nos animais (Tabela 2B).

Para tanto foram realizadas injeções no tempo 0h de PBS no controle (G9), e miotoxina (G1 – G4) ou peçonha bruta (PB) (G5 – G8) dissolvidas em 25 µL de PBS, passados 30 minutos injetou-se novamente no músculo gastrocnêmio dos animais, 25 µL de PBS nos grupos: controle negativo (G9) e nos grupos controles para atividade miotóxica da toxina (G1) e da peçonha (G5); 25 µL de diferentes concentrações entre o soro antiofídico (SA) ou rBaltMIP ou soro antiofídico complementado com rBaltMIP (SA+ rBaltMIP).

A injeção do inibidor foi calculada em razão da proporção da massa molar da BthTX-I/ peçonha (PB) e do inibidor/SA. Para essa atividade, todos os ensaios inibitórios foram realizados na proporção 1:1 (miotoxina/inibidor; miotoxina/SA; peçonha/inibidor; peçonha/SA; miotoxina/SA+inibidor e peçonha/SA+inibidor). A injeção do soro antiofídico (SA) e a quantidade aplicada no animal foram seguidas de acordo com as determinações do fabricante (Para cada 1 mg de soro liofilizado diluir em 1 mL de água destilada, sendo que cada mililitro de soro é capaz de neutralizar 2 mg de peçonha bruta das serpentes do gênero Bothrops).

(G1) solução contendo 50 µg da toxina BthTX-I dissolvida em 25 µL de PBS e após 30 min nova injeção contendo 25 µL de PBS;

(G2) solução contendo 50 µg da toxina BthTX-I dissolvida em 25 µL de PBS e após 30 min nova injeção contendo o rBaltMIP na mesma razão molar, dissolvido em 25 µL de PBS;

(G3) solução contendo 50 µg da toxina BthTX-I dissolvida em 25 µL de PBS e após 30 min nova injeção contendo o SA na mesma razão molar, dissolvido em 25 µL de PBS;

(G4) solução contendo 50 µg da toxina BthTX-I dissolvida em 25 µL de PBS e após 30 min nova injeção contendo o SA complementado com o rBaltMIP, na mesma razão molar, dissolvido em 25 µL de PBS;

(G5) solução contendo 50 µg da PB dissolvida em 25 µL de PBS e após 30 min nova injeção contendo 25 µL de PBS;

(G6) solução contendo 50 µg da PB dissolvida em 25 µL de PB e após 30 min nova injeção contendo o rBaltMIP na mesma razão molar, dissolvido em 25 µL de PBS;

(G7) solução contendo 50 µg da PB dissolvida em 25 µL de PBS e após 30 min nova injeção contendo o SA na mesma razão molar, dissolvido em 25 µL de PBS;

(G8) solução contendo 50 µg da PB dissolvida em 25 µL de PBS e após 30 min nova injeção contendo o SA complementado com o rBaltMIP, na mesma razão molar, dissolvido em 25 µL de PBS;

(G9) solução contendo 25 µL de PBS sozinho e após 30 min nova injeção contendo 25 µL de PBS;

Todas as soluções foram preparadas isoladamente e em seguida foram feitas as aplicações das soluções nos respectivos grupos de animais com seringas para insulina (BD Ultra-Fine II – 8 mm x 0,3 mm). Conforme descrito acima e esquematizado na Tabela 2(B). Após 30 minutos foram feitas novas aplicações com soluções de 25 µL das respectivas soluções, sem haver incubação das mesmas. Após 3 horas das primeiras aplicações (tempo 0 min), o sangue dos animais foi coletado e seus plasmas separados conforme procedimento descrito no item 3.2.7.2.

Tabela 2(B). Esquema de avaliação da neutralização da atividade miotóxica do soro antiofídico comercial complementado ou não com o rBaltMI e sem prévia incubação.

	G1	G2	G3	G4	*G5*	G6	G7	G8	G9
Controle +	+								
rBaltMIP					+				
SA		+				+			
rBaltMIP + SA			+				+		
PBS				+				+	
									+
	BthTX-I				**Peçonha**				

Onde: SA = soro antiofídico.

3.2.10.3. Análise histopatológica das fibras musculares

Após a coleta do sangue para a avaliação dos níveis de CK no plasma dos animais, esses foram eutanasiados por inalação de dióxido de carbono, seguida de deslocamento cervical e uma secção da região central do músculo foi retirada e embebida em solução fixadora (formaldeído 10% em PBS, v/v). O material foi desidratado através do aumento das concentrações de etanol e posteriormente incluído em parafina. Os blocos resultantes foram cortados em secções grossas de 2,5 µm, corados com hematoxilina-eosina 0,25% (m/v) e examinados em microscópio óptico (SANTOS-FILHO et al., 2008). Este experimento foi realizado em colaboração com o Professor Dr. Fábio de Oliveira, UFU, Uberlândia, MG.

3.3. Análise dos resultados

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (SD). A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste ANOVA por análise de variância *One-way* - *Tukey*, com valor $p < 0,05$, considerado como significante. Todas as análises estatísticas foram calculadas utilizando o programa *GraphPad Prism 5*.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção das toxinas BthTX-I e BthTX-II da peçonha de *B. jararacussu*

4.1.1. Cromatografia de exclusão molecular da peçonha de *B. jararacussu*

Para a obtenção das toxinas BthTX-I e BthTX-II utilizadas para testar as propriedades inibitórias do rBaltMIP frente às atividades fosfolipásicas, miotóxicas e edematogênicas inicialmente a peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* foi fracionada por dois passos cromatográficos: uma cromatografia de exclusão molecular e uma cromatografia de troca catiônica. Na cromatografia em Sephadex G-75 pH 8,0, a peçonha bruta de *B. jararacussu* foi desdobrada em cinco diferentes frações denominadas: P1; P2; P3; P4; P5 **(Fig.2A),** sendo que na fração P4 encontram-se as toxinas BthTX-I e II, evidenciadas por análise eletroforética **(Fig. 2a)**.

4.1.2. Cromatografia de troca catiônica da fração P4 da peçonha de *B. jararacussu*

A partir da fração P4 (**Fig. 2A)**, foram isoladas as toxinas bothropstoxinas I e II (BthTX-I e II) de *B. jararacussu* em cromatografia de troca iônica, em resina de CM-Sepharose pH 8,0 **(Fig. 2B).** Desse fracionamento, foram obtidos 4 diferentes frações (CM1; CM2; CM3 e CM4) sendo que a CM2 foi identificada como sendo a BthTX-II por apresentar atividade fosfolipásica e apresentar migração eletroforética idêntica à BthTX-II usada como referência e a fração CM4 foi identificada como sendo a BthTX-I por não apresentar atividade fosfolipásica e apresentar migração eletroforética idêntica à BthTX-I usada como referência **(Fig. 2b)**. As proteínas de referência do padrão da Thermo correspondem a: β-galactosidase (116,0 kDa), Albumina de soro bovino (66,2 kDa), Ovoalbumina (45,0 kDa), Lactato desidrogenase (35,0 kDa), REase Bsp98I (25,0 kDa), β-lactoglobulina (18,4 kDa) e Lisozima (14,4 kDa).

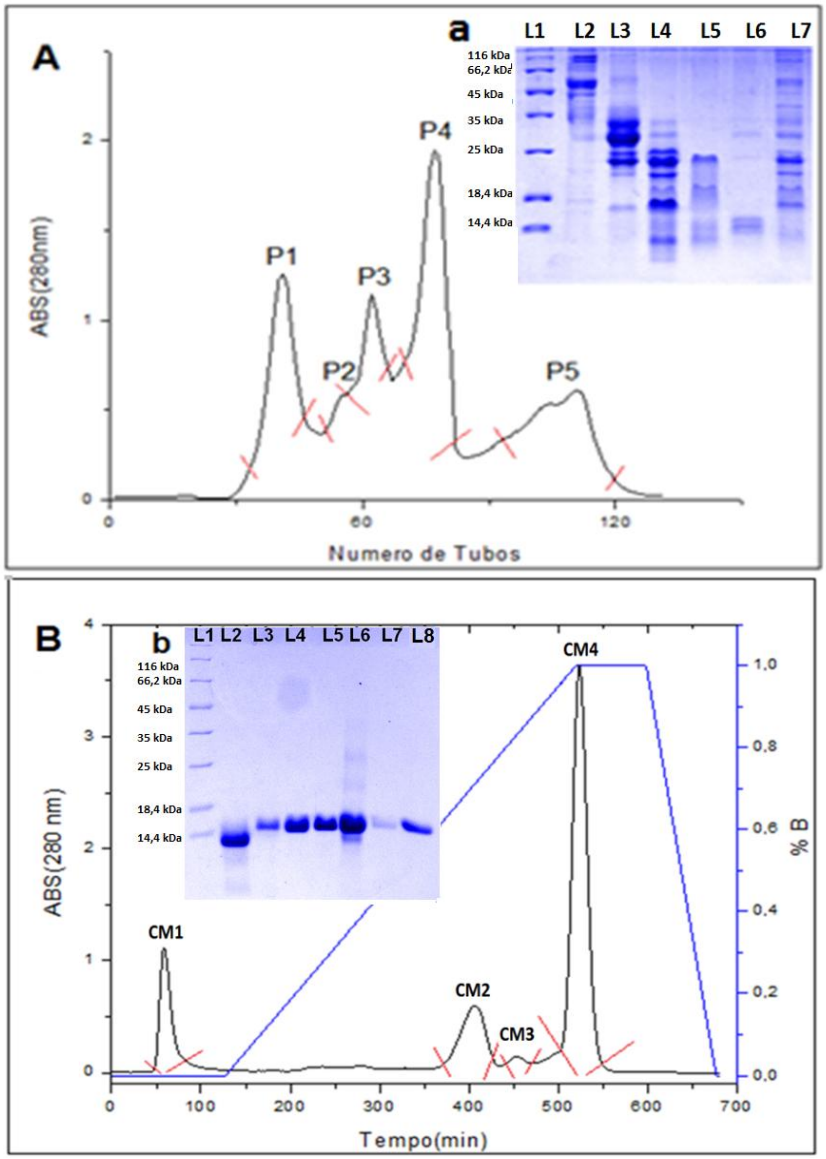


Figura 2. Purificação da BthTX-I e da BthTX-II da peçonha de *B. jararacussu.* **(A)** Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-75 da peçonha bruta de *B.jararacussu.* 500 mg da referida peçonha foram suspensas em AMBIC 50 mM pH 8,0, centrifugadas a 10.000xg por 10 min em temperatura ambiente. e o sobrenadante obtido foi aplicado a uma coluna contendo Sephadex G-75 (110 x 4,0 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição da amostra foi feita com o mesmo tampão, em um fluxo de 30 mL/h e a absorbância medida a 280 nm, em espectrofotômetro BECKMAN DU 640. **(a)** inserido–SDS-PAGE 13,5% das frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular da peçonha bruta de *B. jararacussu:* 1.Marcador de peso molecular; 2.P1; 3.P2; 4.P3; 5.P4; 6.P5; 7.peçonha bruta *B. jararacuçu.* **(B)** Isolamento das bothropstoxinas I e II (BthTX-I e II) por cromatografia de troca iônica em coluna CM-Sepharose, da fração P4 obtida da cromatografia de exclusão molecular da peçonha de *B. jararacussu*. 50 mg da fração P4 foram suspensas em 2,0 mL de AMBIC 50 mM pH 8,0, centrifugadas à 10.000xg por 10 min. em temperatura ambiente e o sobrenadante aplicado à coluna contendo CM-Sepharose (2,0 x 40 cm) acoplada a um sistema FPLC (*AKTAFPLC, GE Healthcare Life Science*) previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição da amostra foi realizada com tampão (A) AMBIC 0,05 M e gradiente de

concentração linear com tampão (B) AMBIC 0,5 M em um fluxo de 1,5 mL/min e a absorbância medida à 280 nm, em espectrofotômetro BECKMAN DU 640. **(b)** inserido–SDS-PAGE das frações obtidas da cromatografia de troca iônica do P4 reduzidas com β –mercaptoetanol. 1.CM1; 2.CM2; 3. CM3; 4.CM4; 5.BthTX-I; 6. BthTX-II e 7 Marcador de peso molecular. As proteínas de referência do padrão da Thermo correspondem a: β-galactosidase (116,0 kDa), Albumina de soro bovino (66,2 kDa), Ovoalbumina (45,0 kDa), Lactato desidrogenase (35,0 kDa), REase Bsp98I (25,0 kDa), β-lactoglobulina (18,4 kDa) e Lisozima (14,4 kDa).

4.1.3. Avaliação do grau de pureza das toxinas

Após a obtenção das toxinas BthTX-I e BthTX-II **(4.1.2.)**, estas toxinas foram submetidas, separadamente, a uma coluna C-18 de fase reversa em sistema HPLC para confirmar a eficiência do processo de purificação das mesmas **(Figs. 3A e 3B).**

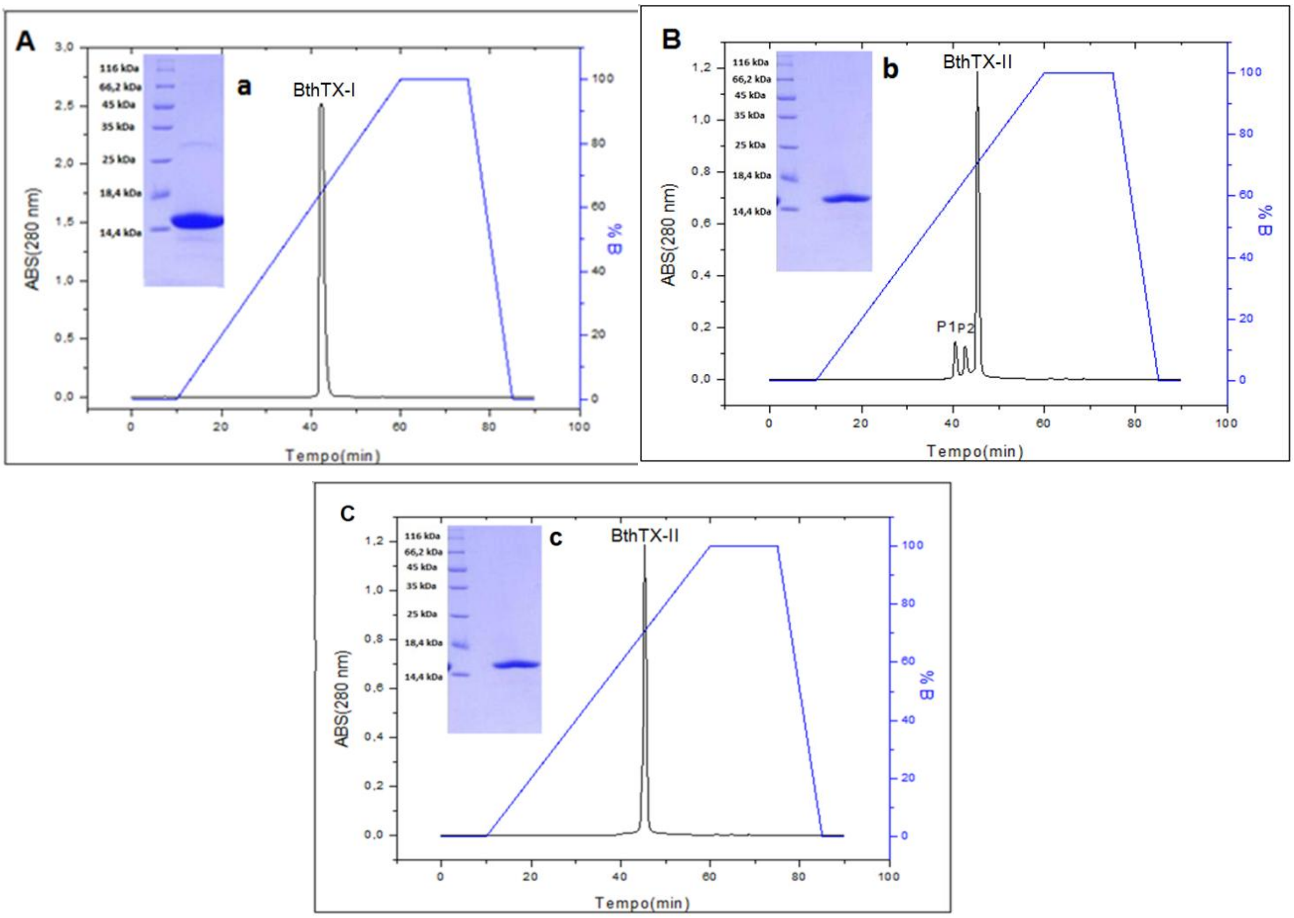


Figura 3. Avaliação do grau de pureza da BthTX-I (A) e BthTX-II (B). A referida avaliação foi realizada em coluna de fase reversa em HPLC utilizando coluna C18. Separadamente, as toxinas BthTX-I (CM4) e BthTX-II (CM2) foram suspensas em 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) (solvente A), centrifugadas a 10.000xg por 10 min. e seus sobrenadantes aplicados em coluna C18 de fase reversa (250 mm x 4,6 mm) previamente equilibrada com a mesma fase móvel em sistema HPLC. As

proteínas foram eluidas com gradiente linear (0-100%) de 70% (v/v) de acetonitrila em 0,1% de ácido trifluoroacético (solvente B), com um fluxo de 1 mL/min. Os perfis de eluição da BthTX-I **(A)** e BthTX-II **(B)** foram monitorados à 280 nm, **(C)** perfil cromatográfico da BthTX-II após recromatografia em HPLC. **(a)** e **(b)** inseridos: SDS-PAGE 13,5% das frações das cromatografias referentes às frações CM4 - massa molecular relativa da BthTX-I **(a)** e CM2 - massa molecular relativa da BthTX-II **(b e c)** comparadas ao marcador de peso molecular. As proteínas de referência do padrão da Thermo correspondem a: β-galactosidase (116,0 kDa), Albumina de soro bovino (66,2 kDa), Ovoalbumina (45,0 kDa), Lactato desidrogenase (35,0 kDa), REase Bsp98I (25,0 kDa), β-lactoglobulina (18,4 kDa) e Lisozima (14,4 kDa).

4.2. Indução da expressão e purificação do inibidor recombinante rBaltMIP

Após 72h de indução da expressão do inibidor recombinante feita com adição de metanol (item 3.2.4.), o sobrenadante do meio de cultura foi centrifugado e purificado com coluna de Ni-Sepharose em concentrações crescentes de imizadol. As alíquotas foram então coletadas e analisadas em SDS-PAGE 13,5% e os poços 3; 4; 5; 6; 7 e 8 apresentaram níveis de expressão significativa do rBaltMIP após 72 h de indução com bandas na posição de ~21 kDa (posição esperada para o inibidor expresso) **(Fig.4A)**. Essas frações que continham o inibidor purificado foram reunidas, liofilizadas e armazenadas a -20^{0}C, sendo em seguida, purificada em coluna C18 em FPLC.

4.2.1. Avaliação do grau de pureza do rBaltMIP

As frações da coluna de Ni-Sepharose do passo anterior (item 4.2.) que continham o rBaltMIP foram cromatografadas em coluna de fase reversa C18 para eliminação de impurezas A fração com tempo retenção de 40 a 45 min., característico do inibidor recombinante **(Fig.4B)** foi separada, reunida, liofilizada e estocada até o momento do uso nos experimentos de neutralização das atividades miotóxicas e edematogênicas das toxinas BthTX-I e BthTX-II. Para comprovar a pureza do rBaltMIP obtido foi feita a recromatografia de uma alíquota da fração obtida do rBaltMIP nas mesmas condições, a qual demonstrou que o inibidor encontrava-se puro **(Fig.4C).**

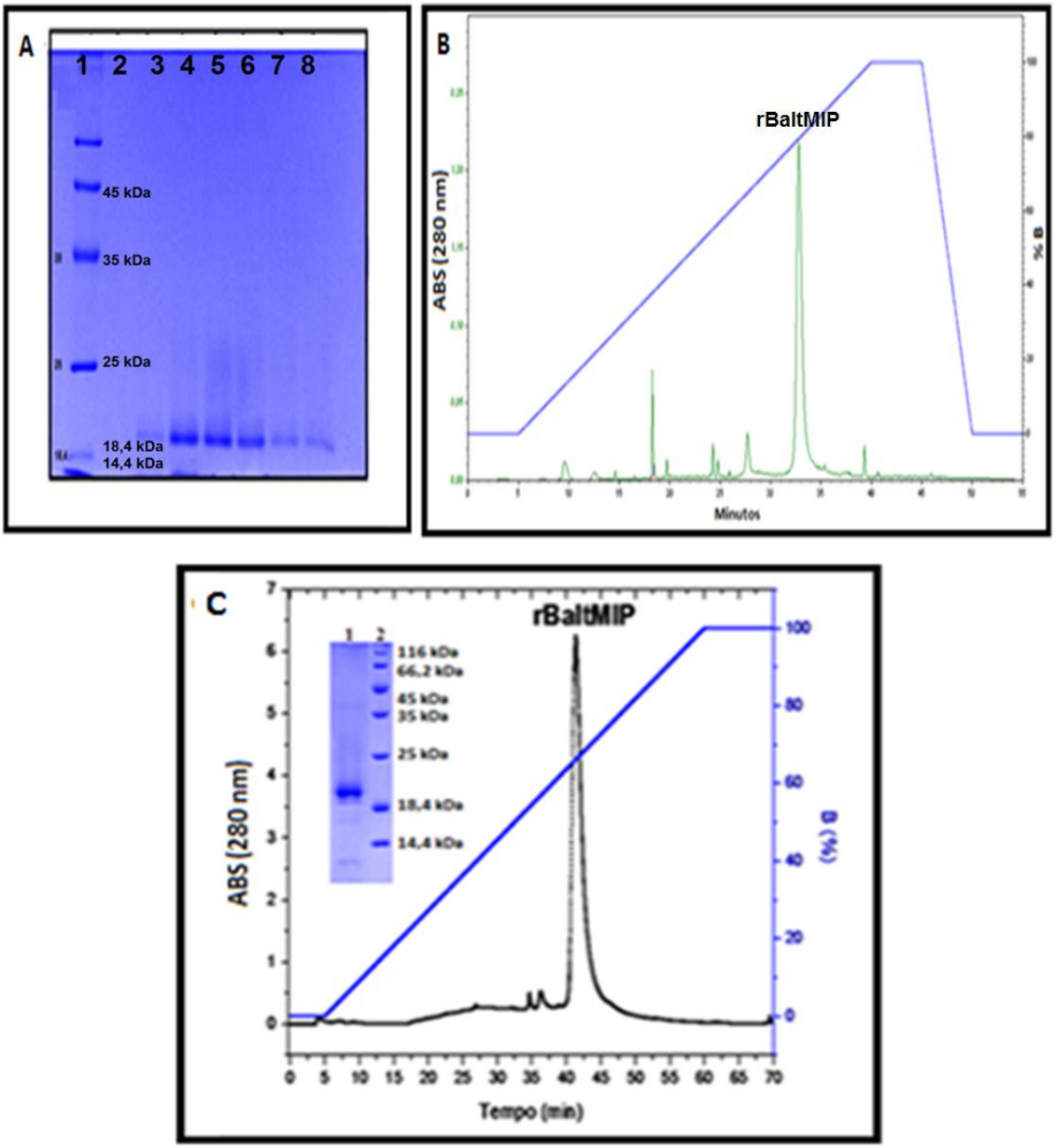


Figura 4. Avaliação da indução da expressão e da pureza do inibidor recombinante após HPLC. (A) Avaliação da indução da expressão do rBaltMIP em *P.pastoris.* O sobrenadante da colônia (item 3.2.4.) foi submetido à coluna de Ni-Sepharose, o inibidor expresso foi eluido com concentrações crescentes de imizadol (75-250 mM), as frações avaliadas em gel de SDS-PAGE e posteriormente liofilizadas. **(A)** Poço 1, marcador de peso molecular; poços: 3; 4; 5; 6; 7 e 8 frações eluidas da coluna de Ni-Sepharose. **(B)** Perfil cromatográfico do material eluido diretamente da coluna de Ni-Sepharose com o rBaltMIP através de cromatografia em coluna de fase reversa em HPLC. As Frações da Ni-sepharose contendo inibidor recombinante expresso **(A)** foram suspensas em 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) (solvente A), a solução foi clarificada por centrifugação à temperatura ambiente e o sobrenadante foi (550 µL) aplicado à coluna C-18 de fase reversa (250 mm x 4,6 mm) previamente equilibrada com a mesma fase móvel. As proteínas foram eluidas com um gradiente linear (0-100%) de 70% (v/v) de acetonitrila em 0,1% de ácido trifluoroacético (solvente B), a um fluxo de 1 mL/min. O perfil de

eluição foi monitorado a 280 nm **(B)**. Perfil cromatográfico de uma alíquota do rBaltMIP após o HPLC mostrando-se sem impurezas **(C).**

4.3. Caracterização Bioquímica do rBaltMIP

4.3.1. Determinação da Massa Molecular

4.3.1.1. Por SDS-PAGE

A massa molecular relativa do inibidor recombinante, estimada através de eletroforese SDS-PAGE 13,5% e interpolação em uma curva logarítmica linear das massas moleculares das proteínas padrão x distância relativa de migração (Rf) de cada proteína no gel, foi de aproximadamente 21 kDa **(Fig.5).**

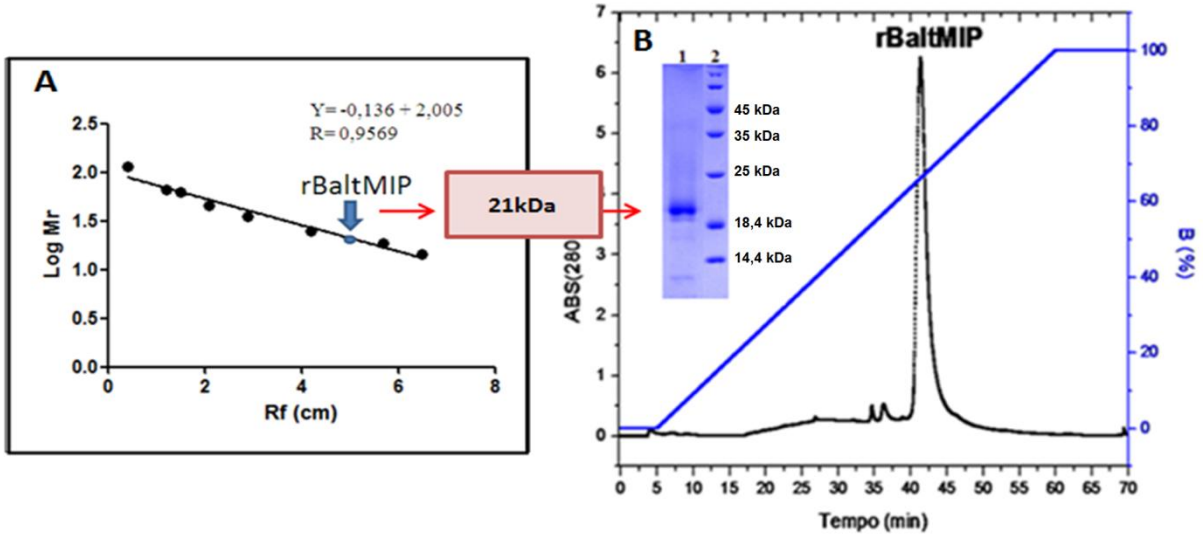


Figura 5. Massa molecular relativa do inibidor expresso. Foi feita uma eletroforese em SDS-PAGE do inibidor rBaltMIP e **(A)** a massa molecular aparente foi calculada através da curva log da massa molecular x Rf, sendo de 21 kDa (seta azul). As proteínas de referência do padrão de massa molecular da Thermo correspondem a: β-galactosidase (116,0 kDa), Albumina de soro bovino (66,2 kDa), Ovoalbumina (45,0 kDa), Lactato desidrogenase (35,0 kDa), REase Bsp98I (25,0 kDa), β-lactoglobulina (18,4 kDa) e Lisozima (14,4 kDa). **(B)** perfil cromatográfico do rBaltMIP após para eliminação de impurezas.

4.3.1.2. Por MALD/TOF/TOF MS

O inibidor recombinante, quando submetido à determinação de massa intacta no modo linear, apresentou uma massa média de 19.572,99 m/z, referente à 19.573,99 m/z menos um próton (MALDI TOF/TOF MS-AXIMA PERFORMANCE, Kratos-Shimadzu, Manchester, UK) **(Fig.6).**

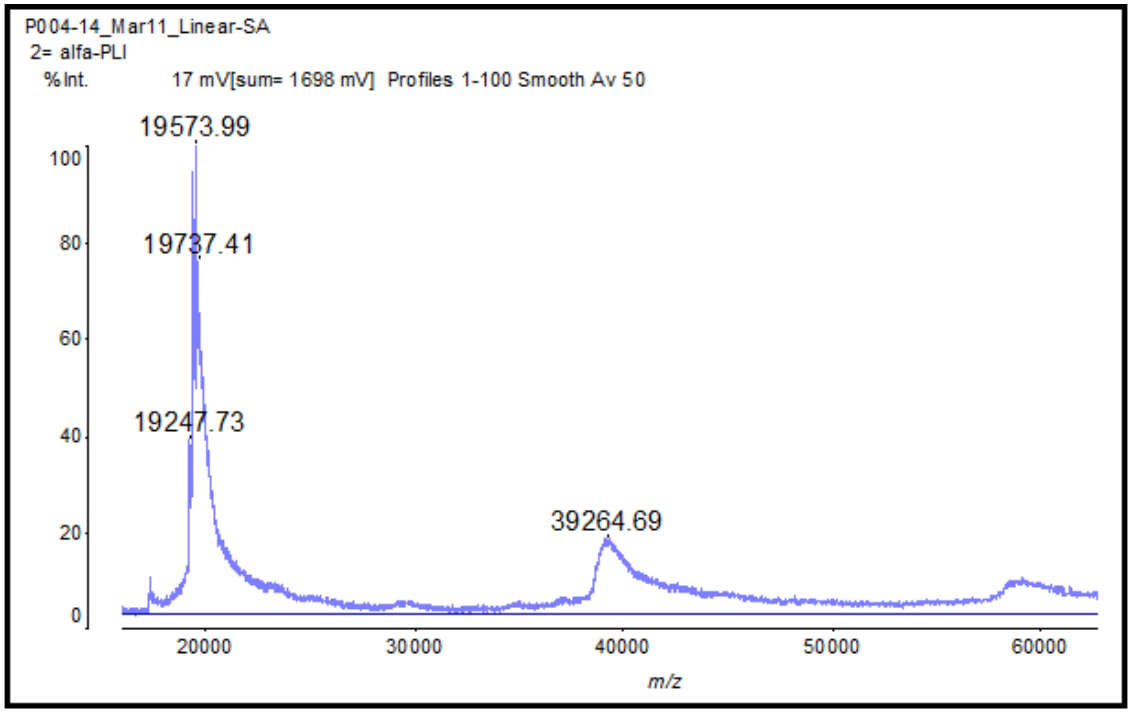


Figura 6. Determinação da Massa Molecular do rBaltMIP por espectrometria de massas. O espectros MS no modo LINEAR do rBaltMIP teve sua massa determinada de 19.572,99 m/z em relação a um padrão de calibração contendo as seguintes proteínas: Insulina (bovina) – 5.734,51; Citocromo C (equino) – 12.361,96; Aldolase (coelho) – 39.212,28; BSA (soro albumina bovina) – 66.430,09 (Massa média e M+H+).

4.3.2. Conteúdo de carboidratos do rBaltMIP após Deglicosilação com PNGase F (D-rBaltMIP)

4.3.2.1. Determinação da massa molecular relativa do rBaltMIP Deglicosilado (D-rBaltMIP) por SDS-PAGE

O rBaltMIP após deglicosilação com enzima PNGase apresentou uma massa molecular relativa de 18,8 kDa **(Fig.7)** em relação o rBaltMIP não

deglicosilado, que apresenta massa molecular relativa de 21 kDa **(Fig.5**), o que representa um conteúdo de carboidrato de 10%.

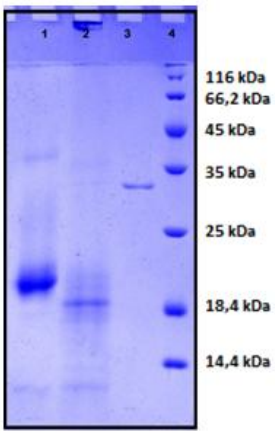


Figura 7. Gel de SDS-PAGE do inibidor recombinante glicosilado e deglicosilado. SDS-PAGE com e sem redução das frações obtidas da deglicosilação do rBaltMIP. 1.rBaltMIP glicosilado e com β-mercaptoetanol; 2. rBaltMIP deglicosilado e com β-mercaptoetanol; 3. Enzima PNGase (10 µg) e 4. Marcador de massa molecular da Thermo, que contém: β-galactosidase (116,0 kDa), Albumina de soro bovino (66,2 kDa), Ovoalbumina (45,0 kDa), Lactato desidrogenase (35,0 kDa), REase Bsp98I (25,0 kDa), β-lactoglobulina (18,4 kDa) e Lisozima (14,4 kDa).

4.3.2.2. Determinação da massa molecular do rBaltMIP Deglicosilado (D-rBaltMIP) por MALD/TOF/TOF MS

A massa molecular do D-rBaltMIP em espectrometria de massas por MALD/TOF/TOF foi de 17.578,39 m/z **(Fig.8)** referente à massa de 17.579,39 m/z menos um próton (MALDI TOF/TOF MS-AXIMA PERFORMANCE, Kratos-Shimadzu, Manchester, UK). Isto representa um conteúdo de carboidrato de cerca de 10% quando comparado ao rBaltMIP não deglicosilado (G-rBaltMIP) obtido pelo mesmo método, que possui massa molecular de 19.572,99 m/z **(Fig.6).**

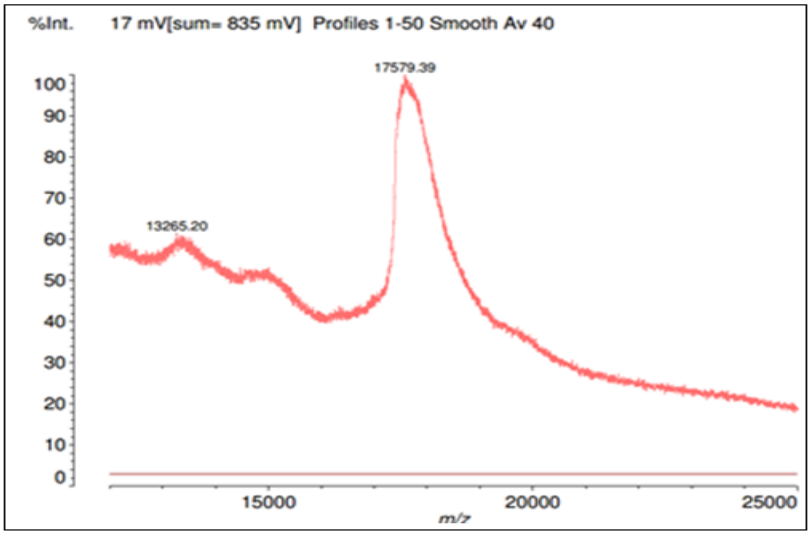


Figura 8. Determinação da Massa Molecular por espectrometria de massas do rBaltMIP deglicosilado. O espectro MS no modo LINEAR do D-rBaltMIP teve sua massa determinada de 17.578,39 m/z em relação a um padrão de calibração contendo as seguintes proteínas: Insulina (bovina) – 5.734,51; Citocromo C (equino) – 12.361,96; Aldolase (coelho) – 39.212,28; BSA (soro albumina bovina) – 66.430,09 (Massa média e M+H+).

4.3.3. Determinação da Massa Molecular do rBaltMIP em solução

O rBaltMIP mostrou-se uma proteína oligomérica de massa molecular 77 kDa de acordo com os padrões de calibração (Bio-Rad) e composta por subunidades de 21 kDa no gel SDS-PAGE **(Fig.5**) e coeficiente de regressão de 0,98 **(Fig.9).**

A determinação da massa molecular do rBaltMIP foi calculada através da uma curva de calibração logarítmica entre o coeficiente de partição (K_{av}) da proteína de interesse com os valores dos padrões conhecidos, onde o valor do K_{av} foi calculado através do seu volume de eluição em cromatografia de gel filtração com coluna Superdex 200 em FPLC **(Fig.9).**

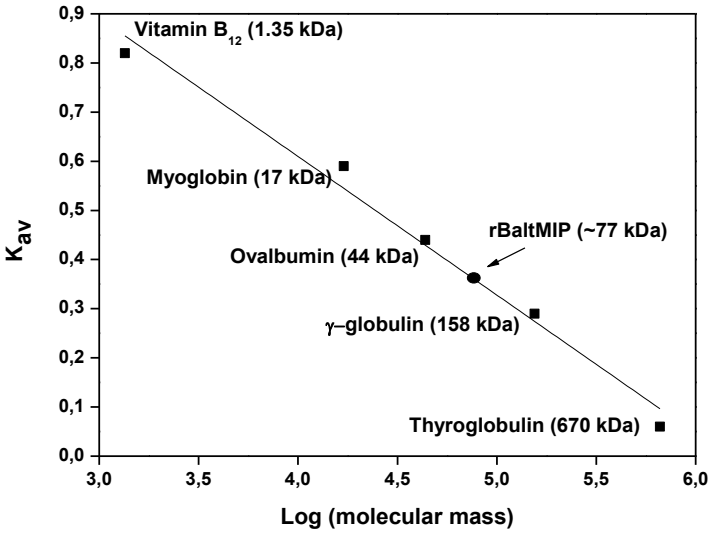


Figura 9. Massa molecular do oligômero. Curva de calibração logarítmica entre o coeficiente de partição (K_{av}) do rBaltMIP com os valores dos padrões conhecidos. O valor do K_{av} foi calculado através do seu volume de eluição em cromatografia de gel filtração em coluna Superdex 200.

4.3.4. Determinação do Ponto isoelétrico do rBaltMIP.

A eletrofocalização do rBaltMIP realizada segundo método descrito no item 3.2.5.3., demonstrou ser o inibidor expresso uma proteína de caráter ácido com um pI aproximado de 5,8 quando determinada pela curva de gradiente de pH onde a migração da amostra no gel teve um Rf de 6,1 cm. **(Fig.10)**

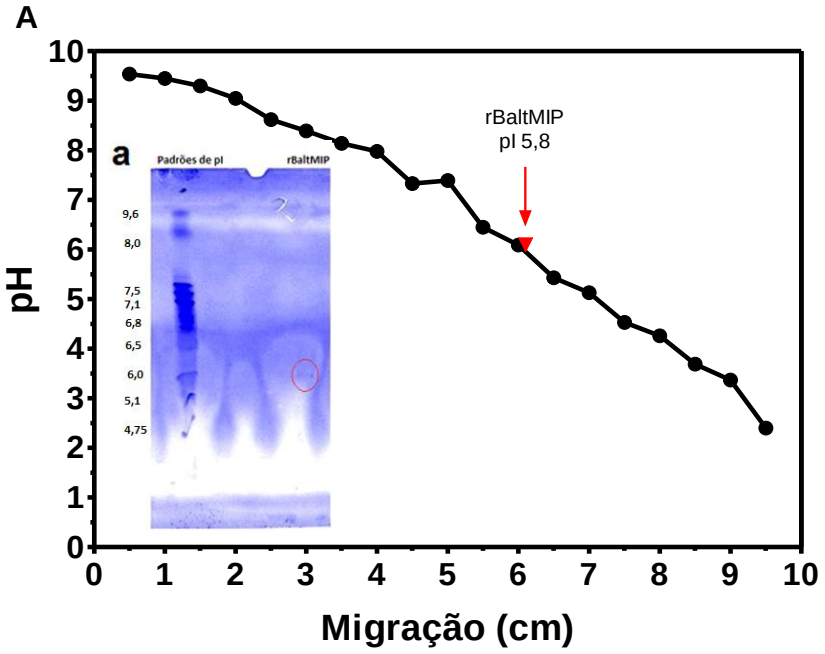


Figura 10. Determinação do ponto isoelétrico (pI). (A) Determinação da curva de gradiente de pH. Após a focalização isoelétrica, tiras foram seccionadas do gel, sendo colocadas em tubo de ensaio contendo 0,5 mL de água destilada para leitura do pH após 2 horas em repouso. Em seguida, o pH do gel foi determinado e o gráfico do gradiente foi traçado. **(a) Focalização isoelétrica:** O gel foi preparado a 7% (m/v) em poliacrilamida (bis-acrilamida: acrilamida 0,8:30), contendo 10% (m/v) de sacarose, 1% (v/v) de anfólito pH 3,0-10,0 (*Pharmacia Biotech*), 0,17% (v/v) de TEMED (Tetrametiletilenodiamina) e 0,075% (m/v) de persulfato de amônio. 10 µL da amostra de rBaltMIP foram aplicados no centro do gel e a focalização prosseguiu por 5 horas a 1500 V, 15 mA e 10 Watts. Padrões de focalização isoelétrica (ficocianina pI 4,45; 4,65 e 4,75; β lactoglobulina B pI 5,1; anydrase carbônica bovina pI 6; anidrase carbônica humana pI 6,4; mioglobulina equina pI 6,8 e 7,0; hemoglobina A pI 7,1; hemoglobina C pI 7,5; lentil lectina pI 7,8, 8,0 e 8,2 e citocromo C pI 9,6) foram corridos em paralelo à amostra nas mesmas condições. Após a focalização isoelétrica o gel contendo a amostra foi fixado em solução de ácido tricloroacético a 10% (m/v) por 30 minutos e corado com *Coomassie Brilliant Blue*. A migração da amostra no gel foi medida obtendo-se um Rf de 6,1 cm, sendo este plotado na curva de gradiente de pH obtendo-se um pI de 5,8.

4.4. Caracterização Estrutural do rBaltMIP

4.4.1. Obtenção dos Peptídeos trípticos do rBaltMIP

Foram deduzidas as sequências de aminoácidos do inibidor recombinante após hidrólise com tripsina 0,5 µg/20 µL em bicarbonato de amônio 0,1 M, sendo obtidos 6 peptídeos (Tabela 3), cujas sequências foram comparadas com outras sequências de moléculas homólogas depositadas nos principais bancos de dados utilizando os programas FASTA (www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/index.html) e BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) **(Fig.11).** O alinhamento e a homologia foram obtidos com o uso do programa Clustal X (versão 2.02) obtendo 100% de homologia entre o inibidor nativo e o recombinante para os peptídeos analisados. São as sequências:

Peptídeo	m/z	"score"	Sequência
1	1651,908	334	LLNSLIDALMHLQR
2	897,496	334	GAFLTVYKAR
3	1118,608	334	EIKNFEALR
4	2248,091	334	QICEQAGGHIPSPQLENQNK
5	918,493	334	AFANVLER
6	2352,102	334	EAYLVVGDSANFTNWAAGEPNK

Tabela 3. Sequências dos peptídeos trípticos. Tabela com massa experimental dos peptídeos, o "score" e as sequências dos 6 peptídeos utilizando o programa Mascot versão 2.4.1 e o banco de dados NCBi.

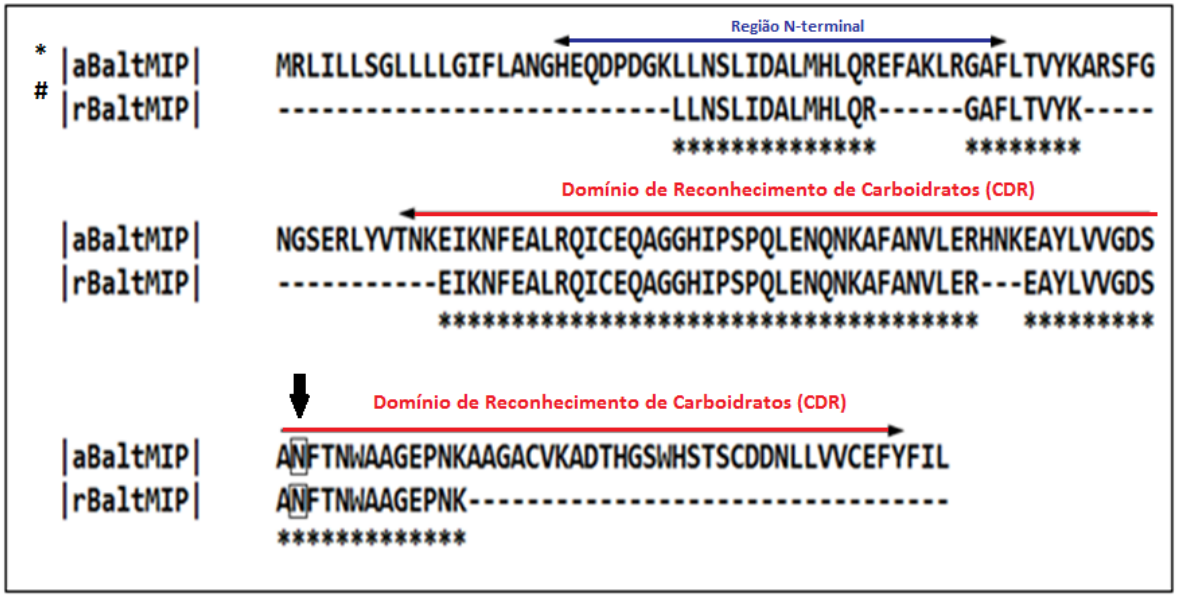


Figura 11. Alinhamento entre as sequências deduzidas de peptídeos trípticos do rBaltMIP obtidos com a sequência de cDNA do αBaltMIP nativo de *B.alternatus*. No alinhamento entre as 6 sequências de peptídeos obtidos utilizando o programa Mascot versão 2.4.1 e o banco de dados NCBi foi constatado 100% de homologia entre os peptídeos encontrados para o inibidor recombinate (*) e entre a sequência predita dos peptídeos do cDNA do inibidor nativo de plasma da serpente *Bothrops alternatus(#)* (EU421904). O sítio de glisosilação está indicado com um retângulo na Asp103, a região do Domínio de Reconhecimento de carboidratos (CDR) referente aos resíduos 49 ao 143 está indicada com uma seta vermelha sobre eles e os resíduos de aminoácidos sublinhados em azul correspondem aos resíduos da região N-terminal da proteína nativa, os quais foram sequenciados por sequenciador automático por degradação de Edman por Santos-Filho (2011).

4.4.2. Grau de homologia do inibidor com inibidores descritos na literatura

Com base nas sequências dos seis peptídeos deduzidos a partir da digestão tríptica, foi realizada uma busca por proteínas homólogas para a comparação e classificação da proteína utilizando-se o programa *Blast*, no banco de dados *Protein* do sítio da *US National Library Medicine National* (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Foi feito ainda o alinhamento de sequência de diferentes alfa inibidores de miotoxinas e PLA_2 com o alfa inibidor recombinante de *B. alternatus* **(Fig.12).** A proteína expressa mostrou alta homologia sequencial com αPLIs purificados a partir de plasma de serpentes. Para o alinhamento múltiplo das sequências dos resíduos de aminoácidos de αPLIs, foi utilizado o programa Clusta X2. O inibidor rBaltMIP foi

alinhado com diferentes sequências de αPLIs com os quais apresentou maior homologia de estrutura primária.

```
Alinhamento                                   Identidade

B.alternatus        MRLILLSGLLLLGIFLANGHEQDPDGKLLNSLIDALMHLQREFAKLRGAFLTVYKARSFG   100%
B.erythromelas      MRLILLSGLLLLGIFLANGHEQDPDGKVLNSLIDALMHLQREVAKLRGAFLTVYKARSFG    96%
B.neuwiedi          MRLILLSGLLLLGIFLANGHEQDPDGKVLNSLIDALMDLQREFAKLRGAFLTVYKARSFG    96%
B.jararaca          MRLILLSSLLLLGIFLANGHEQDPDGKVLNSLIDALMHLQREFANLRGAFLTVHKARSFG    94%
B.moojeni           MRLILLSSLLLLGIFLANGHEEDPDGKVLNSLIDSLMHLQREFANLKDAFLTVHRARSFG    92%
B.jararacussu       MRLILLSGLLLLGIFLANGDEVDPDRKLLNSLIDALMHLQREFANLKGSFLIVHKARSFG    93%
rBaltMIP            ---------------------------LLNSLIDALMHLQ-------GAFLTVYKAR---
                                                :******:**.**       .:****::**

B.alternatus        NGSERLYVTNKEIKNFEALRQICEQAGGHIPSPQLENQNKAFANVLERHNKEAYLVVGDS
B.erythromelas      NGSERLYVTNKEIKNFEALRQICEQAGGHIPSPQLENQNKAFANVLERHNKEAFLVVGDS
B.neuwiedi          NGSERMYVTNKEIKNFEALRQICEQAEGHIPSPQLENQNKAFANVLERHGKEAYLVVGDS
B.jararaca          SGSERLYVTNKEIKNFEALRQICEQAEGHIPSPQLENHNKAFANVLERHGKEAYLVVGDS
B.moojeni           SGSERLYVTNKEIKNFEALRQICEQAEGHIPSPQLENQNKAFANVLERHGKEAYLVVGDS
B.jararacussu       SGSERMYVTNKEIKNFEALRQICEKADGHIPSPQLENQNKAFANVLERHGKEAYLVVGDS
rBaltMIP            --------------------QICEQAGGHIPSPQLENQN--FANVLER--KEAYLVVGDS
                                         ****:* **********:*  *******  ***:******

B.alternatus        ANFTNWAAGEPNKAAGACVKADTHGSWHSTSCDDNLLVVCEFYFIL
B.erythromelas      ANFTNWAAGQPNKAAGTCVKADTHGSWHSASCDDNLLVVCEFYFIL
B.neuwiedi          ANFTNWAAGEPNKAAGACVKADTHGSWHSTSCDDNLLVVCEFYFIL
B.jararaca          ANFTNWAAGEPNKAAGACVKADTHGSWHSTSCDDNLLVVCEFYFYL
B.moojeni           ANFTNWAAGEPNKAAGTCVKADTHGSWHSASCDDNRLVVCEFYFIL
B.jararacussu       ANFTNWAAGEPNKAAGACVKADTHGSWHSASCDDNLLVVCEFYFML
rBaltMIP            ANFTNWAAGEPNK--------------------------------
                    *********.***
```

Figura 12. Alinhamento múltiplo entre as sequências de resíduos de aminoácidos deduzidos do rBaltMIP e outras sequências de αPLIs. Todas as sequências foram obtidas do banco de dados do NCBI. αPLIs: *Bothrops alternatus* (gi:167547091); *Bothrops erythromelas* (gi:167547095); *Bothrops neuwiedi* (gi: 167547137|); *Bothrops jararaca* (gi: 167547111|); *Bothrops moojeni* (gi:218546738); *Bothrops jararacussu*(gi: 167547119|). (*) regiões totalmente conservadas, (:) variação/troca conservativa de um aminoácido, (.) variação/troca não conservativa de um aminoácido.

4.5. Caracterização Funcional das toxinas BthTX-I e BthTX-II

4.5.1. Atividade Fosfolipásica

Após a purificação das toxinas, foi determinada a atividade fosfolipásica das bothropstoxinas I e II, através do método de hemólise radial indireta, conforme descrito no item 3.2.7.1.

A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel é indicativo de atividade fosfolipásica. Como mostra a **Fig.13,** a peçonha de *Bothrops jararacussu* e a BthTX-II apresentaram atividade fosfolipásica enquanto que a miotoxina BthTX-I não apresentou atividade fosfolipásica detectável após permanência em estufa à 37ºC por 12 horas.

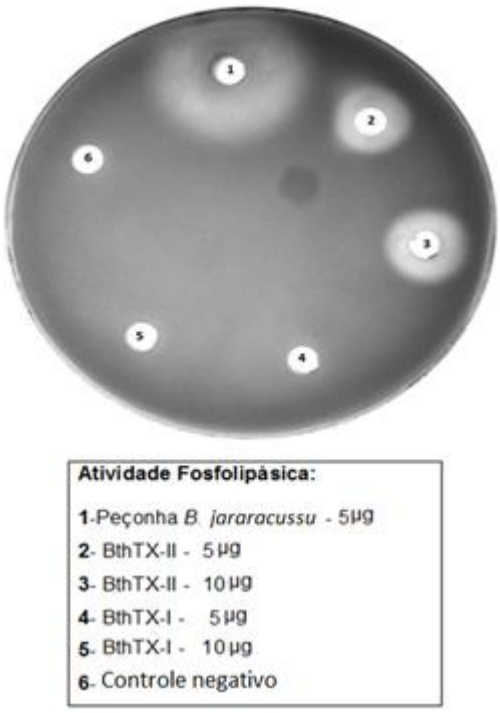


Figura 13. Avaliação da atividade fosfolipásica das bothropstoxinas e da peçonha de *B. jararacussu*. Placa de Agar visualizando os halos produzidos pela peçonha de *B. jararacussu* e toxina BthTX-II mostrando atividade fosfolipásica para BthTX-II pela análise através do método de hemólise indireta, no sentido horário: 1- Peçonha; 2- BthTX-II (5 µg); 3- BthTX-II (10 µg); 4 BthTX-I (5 µg); 5- BthTX-I (10 µg); e 6- controle negativo com PBS.

4.5.2. Atividade miotóxica

Em seguida, foi avaliada a atividade miotóxica das toxinas pela determinação dos níveis de creatina cinase (CK) no plasma de camundongos conforme descrito no item 3.2.7.2.

Com a injeção de 5,0 µg de BthTX-I a atividade miotóxica foi de aproximadamente 1.687 U/L de CK, enquanto que para a BthTX-II a miotoxicidade apresentada para 5,0 µg da toxina foi de 1.031 U/L de CK. O PBS foi usado como controle negativo apresentando 208 U/L de CK e a peçonha de *Bothrops jararacussu* como controle positivo, a qual apresentou 2.500 U/L de CK (**Fig.14).**

Como esperado, foi observado um maior potencial de degradação muscular nos animais em que tiveram a injeção de 5,0 µg de Lys49BthTX-I quando comparado com os animais que receberam a mesma quantidade da Asp49 BthTX-II, corroborando com dados da literatura

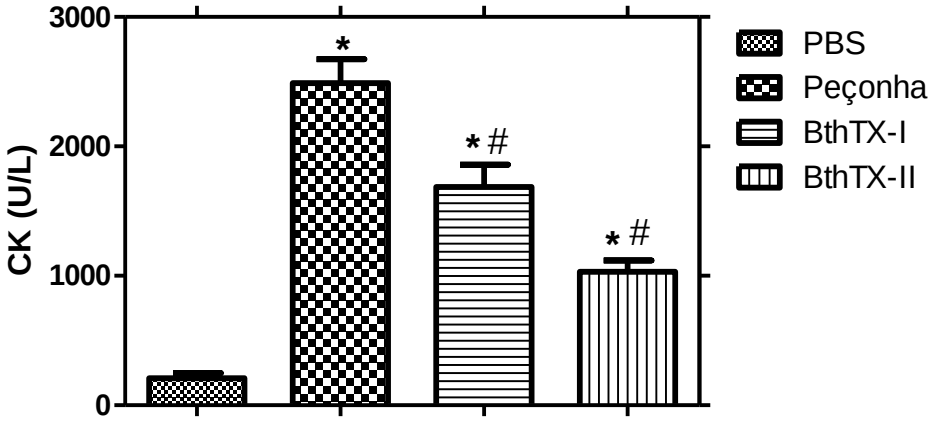


Figura 14. Avaliação da atividade miotóxica. Camundongos machos (Swiss) receberam injeção intramuscular no músculo gastrocnêmico direito com 5 µg das toxinas dissolvidas em 50 µL de PBS. O controle negativo recebeu somente PBS (50 µL), o controle positivo recebeu 5 µg da peçonha bruta de *B. jararacussu (B.jussu)* e os grupos referentes às toxinas receberam 5 µg de cada uma, três horas depois o sangue dos camundongos foram coletados, centrifugados e obtidos os plasmas. A atividade da enzima creatina cinase (CK) foi determinada conforme descrito no item 3.2.7.2. Resultados expressos como a média ± S.D. (n=6) e os resultados estatisticamente significantes ($p<0,05$) foram marcados com * $p<0,05$ diferenças estatísticas significativas quando comparado com o PBS; # $p<0,05$ diferenças estatísticas significativas quando comparado a peçonha de *B.jararacussu* com a BthTX-I e uma ainda maior com relação à BthTX-II.

4.5.2.1. Determinação da CE50 da BthTX-I

A atividade miotóxica da BthTX-I determinada pelas análises de CK plasmáticas conforme item 3.2.8.3.1 pode ser observada na **Fig.15(A).**

Para esta toxina, a concentração efetiva (CE50) para indução de miotoxicidade após 3 horas da injeção da toxina, foi de 0,1256 µg/µL (intervalo de confiança 95% 0,02656 a 0,5936), calculada pelo software GraphPad PRISM 5 .

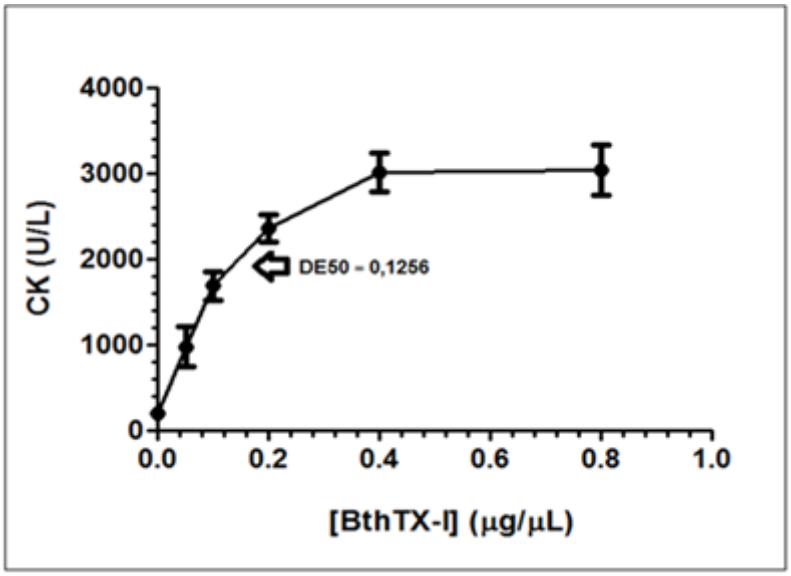


Figura 15(A). Determinação da miotoxicidade (CE50) da BthTX- I. Diferentes concentrações de toxina (0,05; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 µg/µL) foram utilizadas e após 3 horas da injeção no músculo gastrocnêmio de camundongos, a atividade da enzima creatina cinase foi determinada. A concentração efetiva foi a concentração da toxina que causou necrose muscular em 50 dos animais sendo de 0,1256 ug/uL. O intervalo de confiança de 95% (0,02656 a 0,5936) e os resultados de 3 experimentos independentes foram expressos como a média ± S.D. (n=6).

4.5.2.2. Determinação da CE50 da BthTX-II

A atividade miotóxica da BthTX-II (**Fig.15B)** foi avaliada utilizando o mesmo protocolo experimental da **Fig. 15(A)**.

Para a miotoxina BthTX-II a concentração efetiva (CE50) para indução de miotoxicidade após 3 horas da injeção da toxina, foi de 0,6183 µg/µL (intervalo de confiança 95% (0,2686 a 1,423), calculada pelo software GraphPad PRISM 5 .

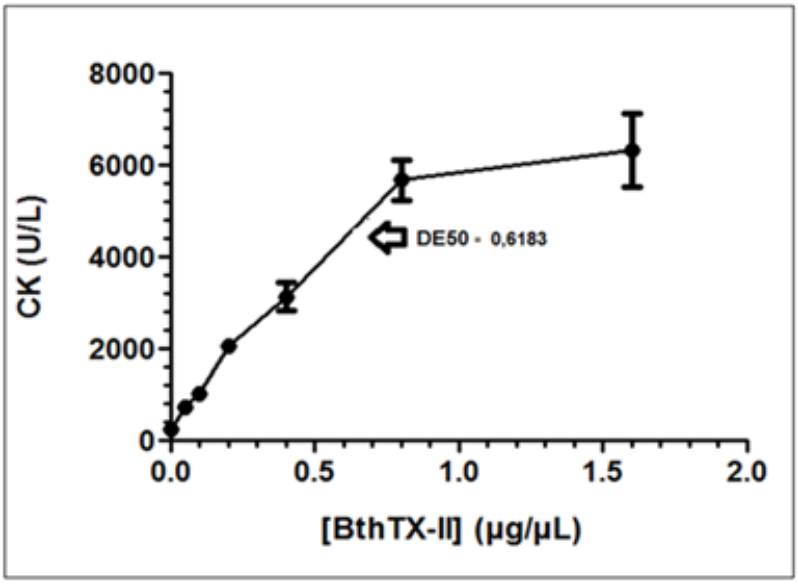


Figura 15(B). Determinação da miotoxicidade (CE50) da BthTX-II. Diferentes concentrações de toxina (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 µg/µL) foram utilizadas. A atividade da enzima creatina cinase foi determinada e aconcentração miotóxica efetiva 50 (CE50) da BthTX-II foi de 0,6183 ug/uL, o intervalo de confiança 95% (0,2686 a 1,423). Os resultados de 3 experimentos independentes foram expressos como a média ± S.D. (n=6).

4.5.2. Atividade edematogênica

4.5.2.1. Determinação da CE50 da BthTX-I

Para a BthTX-I a concentração efetiva (CE50) para indução de edema após 30 minutos da injeção foi de 0,02581 µg/µL (intervalo de confiança 95% 0,01027 a 0,07690), calculada pelo software GraphPad PRISM 5 **(Fig.16A)**.

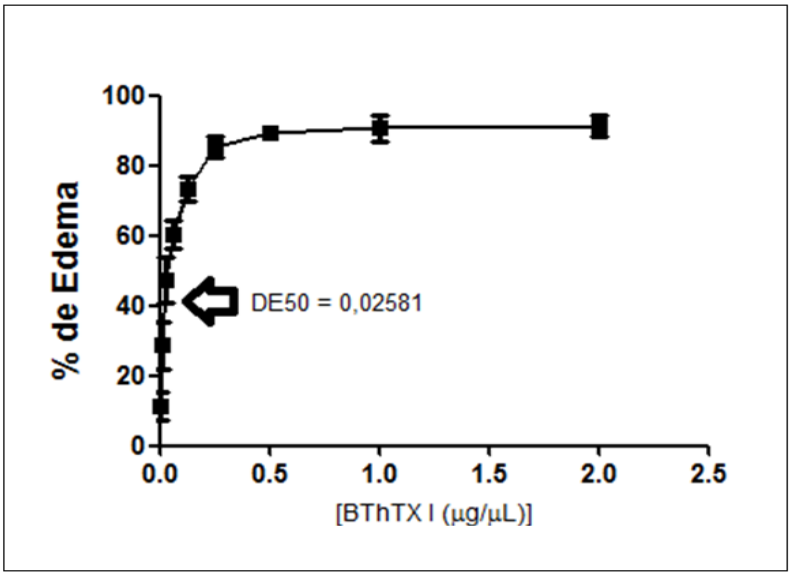


Figura 16(A). Determinação da atividade edematogênica (CE50) da BthTX-I. Diferentes concentrações de toxina (0,0078; 0,0156; 0,0312; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 µg/µL) foram injetadas em camundongos em uma solução de 50 µL de PBS. Após 30 minutos da injeção subplantar da toxina foi determinada a porcentagem do edema de pata sendo a concentração edematogênica efetiva 50 (CE50) de 0,02581 µg/µL (intervalo de confiança 95% - 0,01027 a 0,07690). Os resultados de 3 experimentos foram expressos como a média ± S.D. (n=6)

4.5.3.2. Determinação da CE50 da BthTX-II

A atividade edematogênica da BthTX-II pode ser observada na **Fig.16(B)** Para a BthTX-II a concentração edematogência efetiva 50 (CE50) foi de 0,02810 µg/µL (intervalo de confiança 95% - 0,01554 a 0,04286), calculada no software GraphPad PRISM 5.

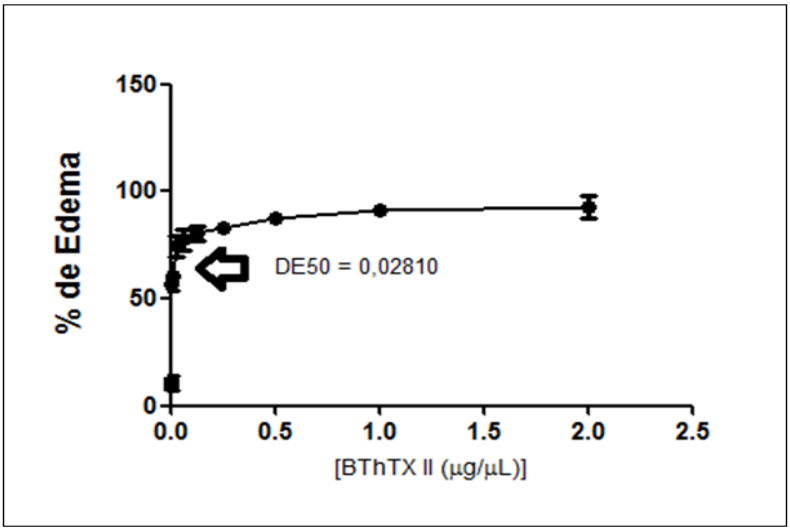


Figura 16(B). Determinação da atividade edematogênica (CE50) da BthTX-II. Diferentes concentrações de toxina (0,0078; 0,0156; 0,0312; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 µg/µL) foram injetadas em camundongos em uma solução de 50 µL de

PBS. Após 30 minutos da injeção subplantar das toxinas foi determinada a porcentagem do edema causado na pata. A concentração edematogênica efetiva 50% foi de 0,02810 µg/µL (intervalo de confiança 95% - 0,01554 a 0,04286). Os resultados de 3 experimentos foram expressos como a média ± S.D. (n=5).

4.6. Caracterização Funcional do rBatMIP

4.6.1. Inibição da atividade miotóxica da BthTX-I e BthTX-II por rBaltMIP

Através das concentrações efetivas (CE50) de indução de miotoxicidade encontradas para as bothropstoxinas I e II, foram testados os potenciais de inibição destas toxinas pelo inibidor de PLA_2 heterólogo rBaltMIP. Para isso, foram usadas duas razões molares entre toxina e inibidor nas proporções de 1:1 e 1:2 (mol/mol) e a atividade miotóxica total apresentada por cada toxina foi considerada como 100%.

Os grupos controles de ambos os experimentos, que receberam injeção de 50 µL de PBS no músculo gastrocnêmio apresentaram níveis basais de CK de cerca de 6%. Para a BthTX-I, na presença do inibidor na razão molar 1:1 e 1:2 observou-se inibição significativa da atividade miotóxica de aproximadamente 53 e 62%, respectivamente **(Fig.17A)**; enquanto que para a BthTX-II, a inibição da atividade miotóxica foi de aproximadamente 55 e 57%, respectivamente **(Fig.17B)**.

O inibidor sozinho não induziu motoxicidade quando comparado com o grupo controle em ambos os experimentos.

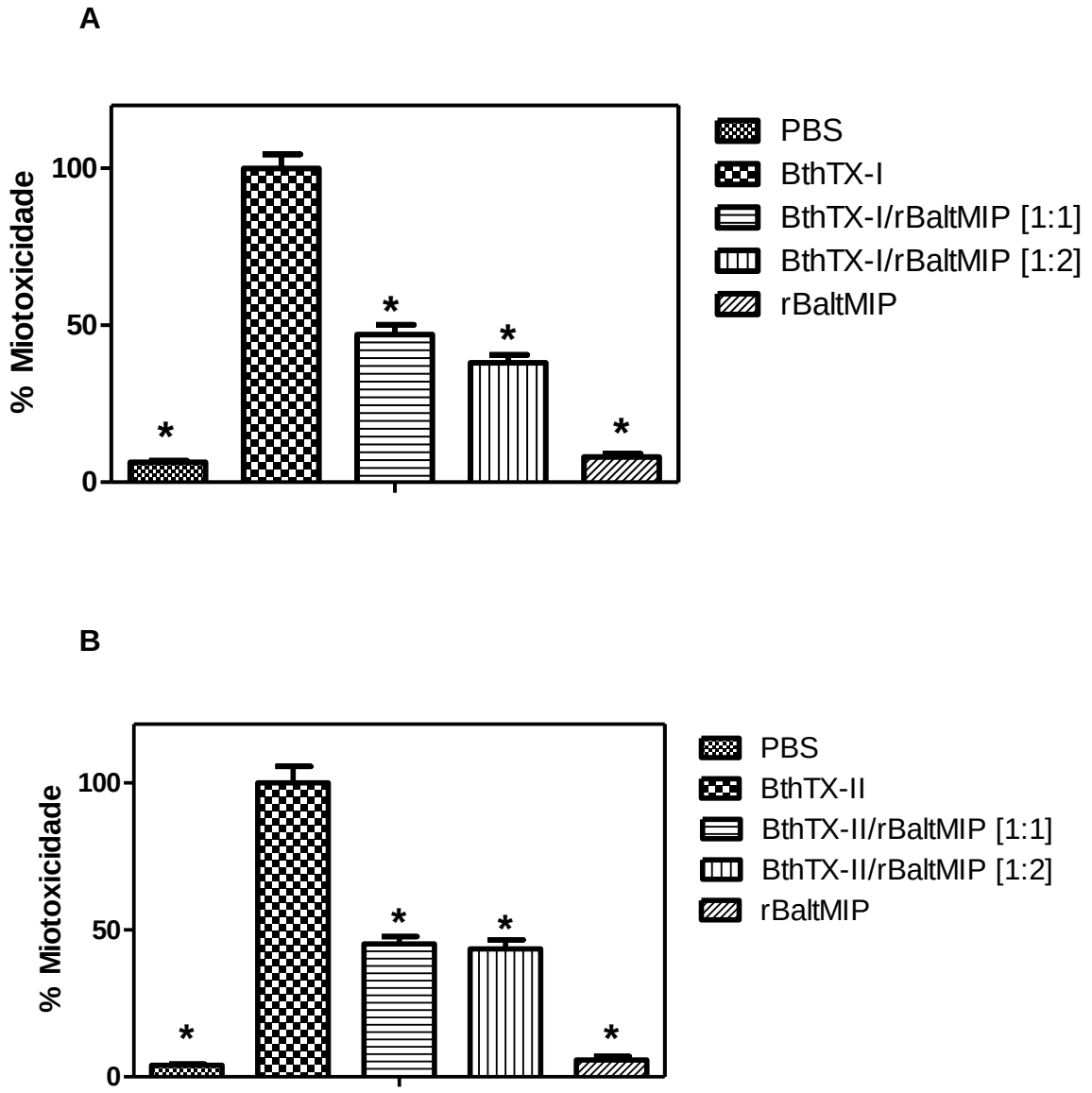


Figura 17. Inibição da atividade miotóxica da BthTX-I (A) e BthTX-II (B) pelo rBaltMIP. As toxinas foram previamente incubadas com o inibidor em diferentes razões molares (mol/mol) 1:1 e 1:2 à 37ºC por 30 min. A atividade total das toxinas foi considerada como 100% e a inibição da miotoxicidade da BthTX-I pelo rBaltMIP foi de 53 e 62% nas razões molares de: 1:1 e 1:2, respectivamente **(A)**, e para a BthTX-II, foi de aproximadamente 55 e 57%, respectivamente **(B)**. Os resultados de três experimentos distintos para cada toxina foram expressos como a média ± S.D. (n=6) e os resultados estatisticamente significantes ($p<0,05$) foram marcados com (*) para as diferenças estatísticas significativas quando comparado com as toxinas BthTX-I e BthTX-II.

4.6.3. Inibição da atividade edematogênica das toxinas BthTX-I e II pelo inibidor rBaltMIP

Nos experimentos de inibição da atividade edematogênica das toxinas BthTX-I e BthTX-II o grupo controle, que recebeu injeção subplantar de 50µl de PBS, apresentou um pequeno aumento da pata de cerca de 30% em relação ao tamanho da pata inicial devido ao volume de PBS injetado.

A atividade edematogênica apresentada pelas bothropstoxinas I e II foi considerada como 100% e quando injetadas em solução com o inibidor rBaltMIP observou-se inibição significativa da atividade edematogênica apresentada nas razões molares 1:2 e 1:7 (BthTX-I/rBaltMIP) de 17% e 20%, respectivamente. Para a toxina BthTX-II, foi observada uma diminuição do edema causado pela toxina quando injetada em solução com o rBaltMIP, na razão molar 1:2 e 1:7 de aproximadamente 20% e 40%, respectivamente.

O inibidor sozinho não induziu edema, quando comparado com o grupo controle em nenhum dos experimentos **(Fig.18 A e B).**

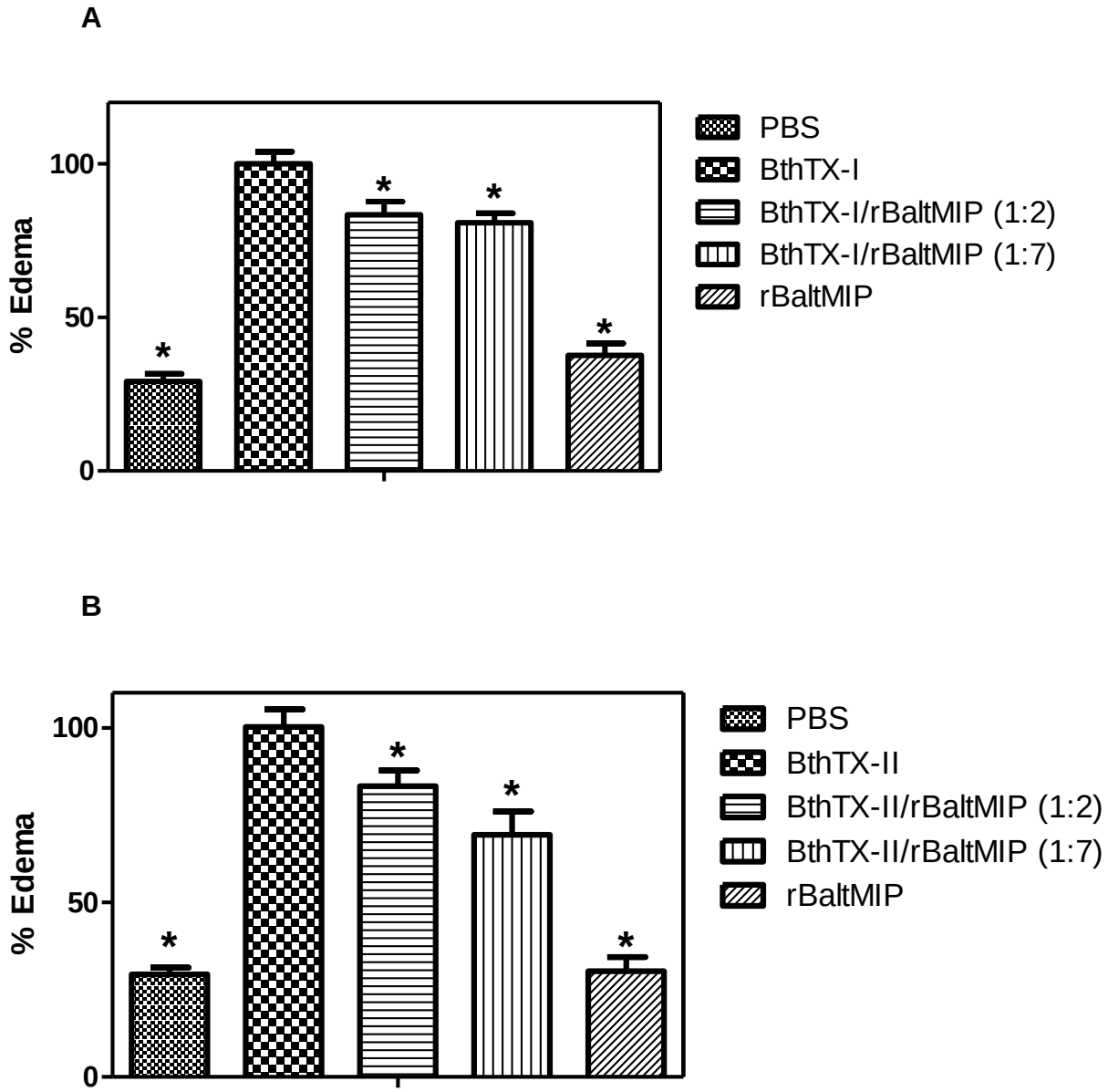


Figura 18. Inibição da atividade edematogênica da BthTX-I (A) e BthTX-II (B) pelo rBaltMIP. As toxinas foram previamente incubadas com o inibidor em diferentes razões molares (mol/mol) 1:2 e 1:7 à 37ºC por 30 min. A atividade total das toxinas foi considerada como 100% e a inibição do edema produzido pela BthTX-I pelo rBaltMIP foi de 17% e 20%, nas razões molares BthTX-I/rBaltMIP de 1:1 e 1:7, respectivamente **(A)**, e para a BthTX-II, nas razões molares, BthTX-II/rBaltMIP de 1:1 e 1:7 foi de aproximadamente 20% e 40%, respectivamente **(B).** Os resultados de três experimentos distintos para cada toxina foram expressos como a média ± S.D. (n=6) e os resultados estatisticamente significantes ($p<0,05$) foram marcados com (*) $p<0,05$, para as diferenças estatísticas significativas quando comparado com o BthTX-I e BthTX-II.

4.7. Avaliação do potencial imunogênico do rBaltMIP

4.7.1. Imunização de animais e obtenção de anticorpos policlonais anti-rBaltMIP em soro.

Contra o antígeno rBaltMIP foram imunizados 3 camundongos machos da linhagem BALB/c seguindo o protocolo descrito no item 3.2.9.1. Os soros pré-imunes obtidos do sangue coletado dos três camundongos BALB/c antes do contado dos antígenos (rBaltMIP) foram utilizados como controle negativo na análise, por ELISA e comprovaram a eficiência do procedimento de imunização.

Foram realizadas três imunizações com inibidor recombinante por via intraperitoneal, sendo a primeira feita no dia zero com a utilização de adjuvante completo de Freund, a segunda foi feita após 15 dias e a terceira após trinta dias, sendo estas feitas sem a emulsão com adjuvante. Após cada uma das três imunizações foi coletado sangue dos três camundongos e separados seus soros para as análises de ELISA (item 2.3.9.3) e *Western Blotting* (item 2.3.9.4.), os quais confirmaram a produção de anticorpos anti-rBaltMIP e a especificidade do inibidor heterólogo pela toxina BthTX-I, conforme resultados descritos nos próximos itens.

4.7.2. Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP em soros de camundongos imunizados por ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

A produção de anticorpos policlonais contra o antígeno rBaltMIP foi confirmada através do monitoramento da Resposta Imune Humoral por ELISA em todas as diluições testadas dos soros dos animais imunizados. Todos os poços contendo as amostras dos soros dos três animais nas diluições testadas (1:1000, 1:2000, 1:4000 e 1:8000) mostraram sensibilidade à detecção do inibidor rBalMIP através do ensaio de ELISA já após a primeira imunização, sugerindo que o rBaltMIP seja imunogênico. Como era de se esperar, nos soros pré-imunes não foi observada presença de anticorpos anti-rBaltMIP.

A proteína bloqueadora (gelatina 3%) não apresentou reatividade com os anticorpos primários e/ou secundários, e o controle do anticorpo secundário (anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo conjugado a peroxidase) mostrou-se eficiente, não havendo reatividade na ausência do anticorpo primário contra o rBaltMIP.

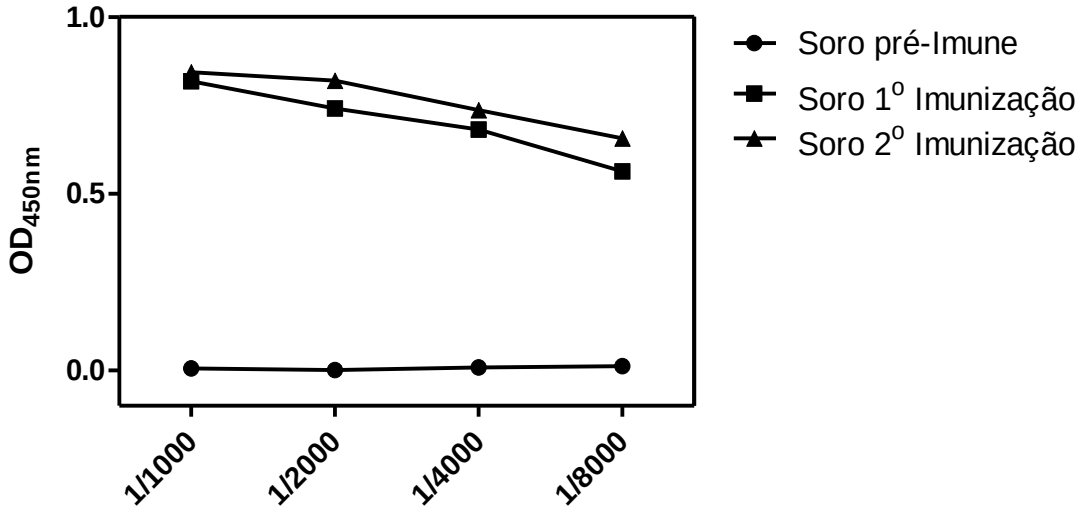


Figura 19. Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP em soros. Detecção dos anticorpos policlonais contra o antigeno rBaltMIP confirmados por ELISA mostrando a média da densidade óptica obtida dos soros dos três animais nas diluições de 1:1000; 1:2000; 1:4000 e 1:8000 (Spectramax Plus – Molecular Devices). A alta reatividade observada indica um potencial imunogênico do rBaltMIP em produzir anticorpos policlonais anti-rBaltMIP quando administrado em doses repetidas em intervalos de 15 e 30 dias e quando emulsificado com adjuvante completo de Freund a primeira imunização (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA), por via intraperitoneal.

4.7.3. Avaliação da especificidade do rBaltMIP pela BthTX-I

Os ensaios de ELISA demonstraram que o rBaltMIP é altamente especifico para toxina BthTX-I utilizada no teste. Nos poços em que houve a complexação do inibidor com a toxina foi observada reatividade do complexo formado com o anticorpo do soro dos camundongos imunizados havendo sensibilidade à detecção do inibidor rBaltMIP através do ensaio de ELISA na diluição 1:4000. Nota-se inclusive, um aumento da reatividade no soro da 2^0 imunização quando comparado com o soro da 1^0, indicando uma maior quantidade de anticorpos anti-rBaltMIP nos animais da 2^0 imunização, como esperado. Verificou-se também que mesmo havendo o complexo toxina + inibidor, não ocorre reatividade quando na ausência do anticorpo – soro pré-imune. Já nos poços onde houve a adição do anticorpo, mas não havia presença do antígeno, poços em que apenas foi utilizado a BthTX-I como *coating* sem o rBaltMIP, notou-se que não houve reatividade indicando que o anticorpo policlonal anti-inibidor produzidos por imunização não se ligou à toxina

quando esta estava sem a presença do inibidor. Da mesa forma, não foi observada reatividade entre o anticorpo e o *coating* feito com BSA.

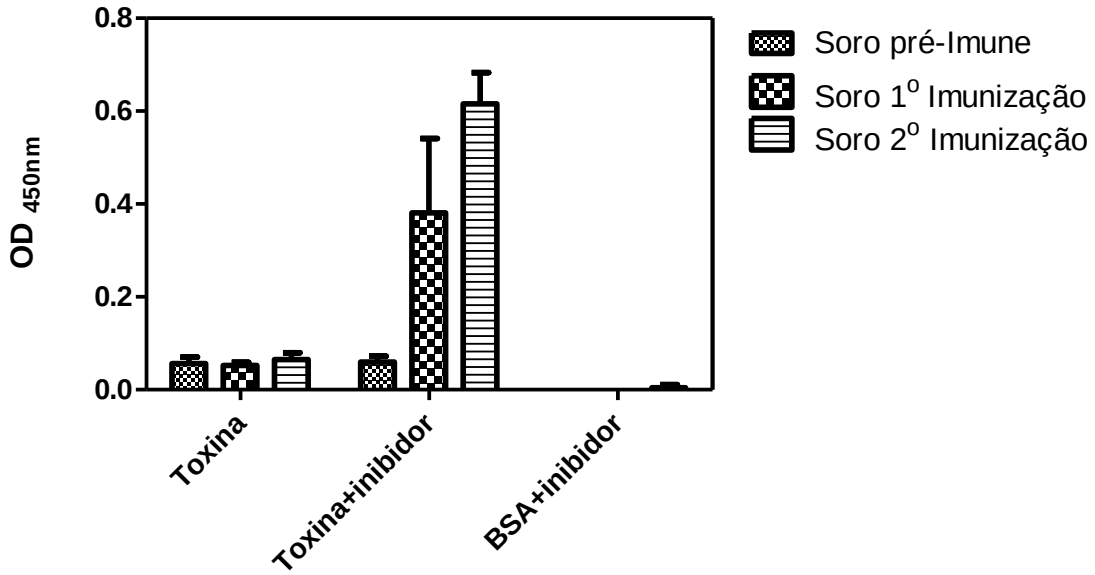


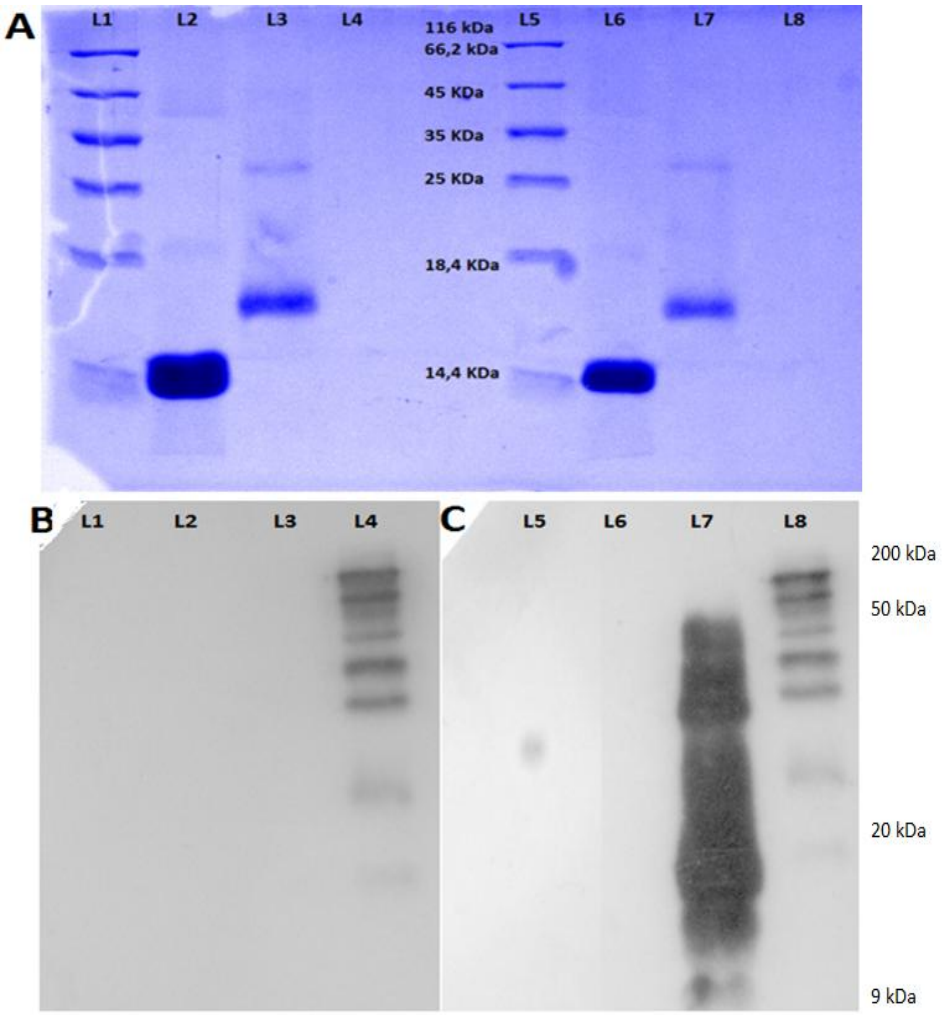
Figura 20. Especificidade do anticorpo rBaltMIP para a toxina BthTX-I. Os resultados do teste de ELISA mostram graficamente que os anticorpos anti-rBaltMIP se ligam apenas ao seu antígeno rBaltMIP e a este quando complexado à toxina BthTX-I, não sendo observada reatividade quando na presença apenas da toxina ou BSA, quando usados como *coating.* Verifica-se também, que o soro pré-imune não contém anticorpos, uma vez que não mostrou reatividade mesmo quando na presença da toxina complexada com o inibidor.

4.7.4. Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP, em soros de camundongos imunizados, por *Western Blotting*

Amostras de rBaltMIP e da toxina BthTX-I foram submetidas a SDS-PAGE 12% **(Fig.21A)** em condições redutoras utilizando β-Mercaptoetanol obtendo-se massas moleculares relativas de ~17,5 kDa e ~13,6 kDa, respectivamente. Em seguida as proteínas foram eletrotransferidas do gel para membrana de nitrocelulose (Item 3.2.9.4.), a membrana foi corada com corante *Ponceau S*. e após o bloqueio, a membrana foi cortada em duas onde cada uma continha o perfil eletroforético da toxina e do inibidor. Uma membrana foi colocada em solução contendo o soro pré-imune dos animais antes da imunização contra rBaltMIP na diluição 1:10000 (v/v) em PBS Tween 20 e a outra membrana na presença de soro imune contendo anticorpos policlonais anti-rBaltMIP na diluição 1:10000 (v/v), por cerca de 12 horas (*overnight*), sob lenta agitação.

A imunorreatividade para o rBalMIP foi detectada usando-se luminol, com a solução *Luminata™ Forte Western Blotting HRP Substrate* (Millipore™) e filme fotográfico (*Amersham Hyperfilm ECL™* –GE Healthcare, Alemanha).

Na membrana tratada com o soro que não continha anticorpos anti-rBaltMIP (pré-imune) não foi observado reação positiva (sensibilização do filme fotográfico) tanto da toxina quanto do inibidor, observado-se na membrana apenas reação com o padrão biotinilado **(Fig.21B)**. Já a parte da membrana tratada com o soro que continha anticorpos anti-rBaltMIP mostrou reação positiva apenas no poço referente ao rBaltMIP e ao padrão biotinilado **(Fig.21C**), confirmando assim, a especificidade dos anticorpos anti-rBaltMIP presentes no soro da segunda imunização ao inibidor recombinante e não à toxina.



Figuras 21. SDS-PAGE a 12% com perfis eletroforéticos da BthTX-I e rBaltMIP (A) e Revelação das membranas de *Western blotting* (B) e (C). (A) Os perfis da BthTX-I (10 µg) e do rBaltMIP (10 µg) em SDS-PAGE mostram massas moleculares relativas de ~13,6 kDa e ~17,5 kDa, respectivamente, em condições redutoras com β-Mercaptoetanol. Nos poços 1 e 5 - marcadores de peso molecular; 2 e 6 - toxina BthTX-I; 3 e 7 - inibidor recombinante rBaltMIP e 4 e 8 - padrão de peso molecular com proteínas biotiniladas (não visíveis nesta coloração). As proteínas de referência do padrão molecular correspondem a: β-galactosidase (116,0 kDa), Albumina de soro bovino (66,2 kDa), Ovoalbumina (45,0 kDa), Lactato desidrogenase (35,0 kDa), REase Bsp98I (25,0 kDa), β-lactoglobulina (18,4 kDa) e Lisozima (14,4 kDa). **(B)** Membrana incubada com soro pré-imune e **(C)** membrana com soro pós-2^0 imunização com inibidor recombinante rBaltMIP. Nota-se o reconhecimento específico dos anticorpos contra o inibidor (L7), bem como o padrão de proteínas biotiniladas à direita de cada membrana (L4 e L8).

4.7.5. Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP, em soros de camundongos, em experimento de miotoxicidade.

Os resultados demostram que o rBaltMIP é imunogênico quando administrado em repetidas doses (15 e 30 dias). Com o intuito de verificar a viabilidade deste inibidor de necrose muscular, ser utilizado como complemento à soroterapia antiofídica, o ideal seria que ele não produzisse anticorpos anti-rBaltMIP. Assim, com o objetivo de verificar se o tratamento com rBaltMIP induziria produção de anticorpos anti-inibidor, foi testado o seu potencial imunogênico, simulando em animais a injeção de uma miotoxina juntamente com o inibidor rBaltMIP e verificando se nestas condições, o inibidor recombinante expresso seria ou não imunogênico.

Desta forma, foi feito um ensaio de inibição de miotoxicidade (n=4) conforme descrito no item 3.2.7.2., injetando-se no músculo gastrocnêmio de camundongos rBaltMIP juntamente com uma toxina comprovadamente miotóxica, neste caso escolhemos a Lys49 BthTX-I, na proporção molar 1:1 e após 15 dias foram coletados o sangue dos animais e separados os soros. Em seguida foi feito um teste de ELISA para constatar se houve ou não produção de anticorpos anti-rBaltMIP nestes animais.

Através deste ensaio não foi observada a produção de anticorpos anti-rBaltMIP quando o inibidor foi usado como tratamento contra a miotoxicidade induzida pela BthTX-I **(Fig.22)**, reforçando o potencial do inibidor rBaltMIP de ser utilizado em complemento à soroterapia antiofídica neutralizando a ação miotóxica da toxina sem, no entanto, ser imunogênico.

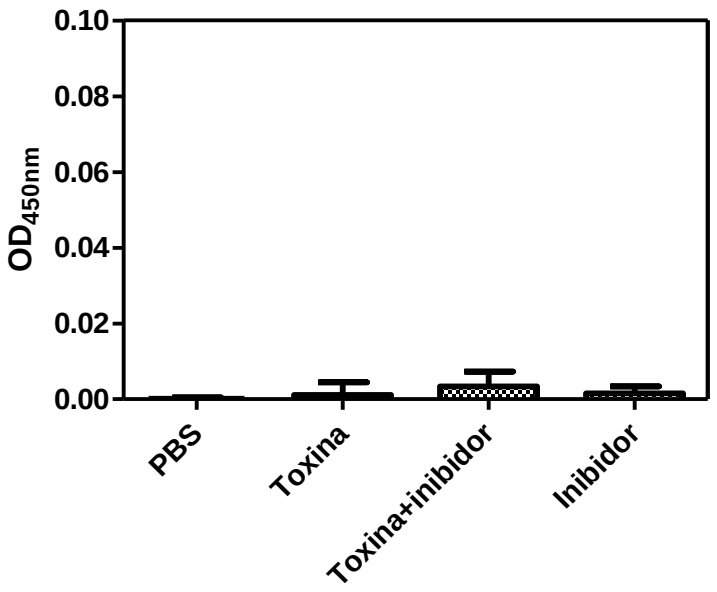


Figura 22. Produção de anticorpos anti-rBaltMIP em soros de camundongos em tratamento com rBaltMIP. Em experimento de inibição de miotoxicidade (n=4) injetando-se no músculo gastrocnêmio de camundongos uma solução de rBaltMIP com BthTX-I, na proporção molar 1:1, não foi observada a produção de anticorpos anti-rBaltMIP no soro dos animais após 15 dias pelo ensaio de ELISA.

4.8. Neutralização da miotoxicidade da toxina BthTX-I pelo soro antiofídico e rBaltMIP: determinação dos níveis de creatina cinase (CK) e análise histopatológica das fibras musculares

O soro antiofídico polivalente de uso veterinário da marca Rasg & Aplik (lema bioLOGIC do Brasil Ltda) foi testado para a avaliação das propriedades inibitórias frente à miotoxina Lys49 PLA_2-símile BthTX-I e peçonha bruta de *B. jararacussu*. A atividade miotóxica foi realizada de duas formas distintas, a primeira com medição dos níveis de creatina cinase (CK) no plasma e a segunda por meio da análise histopatológica das fibras musculares dos músculos gastrocnêmios dos camundongos. Os animais utilizados nesses testes receberam injeção i.m. no músculo gastrocnêmio contendo 50 µL de PBS sozinho ou com 50 µg da miotoxina BthTX-I isolada ou previamente incubada com rBaltMIP, soro antiofídico ou soro antiofídico complementado com rBaltMIP (item 3.2.10.)

As concentrações de incubação do rBaltMIP usadas foram na proporção 1:1 em razão molar (miotoxina/inibidor): miotoxina + rBaltMIP; miotoxina + soro antiofídico; miotoxina + rBaltMIP + soro antiofídico (SA); peçonha bruta de *Bothrops jararacuçu* + rBaltMIP; peçonha bruta + SA e peçonha bruta + miotoxina + SA.

4.8.1. Neutralização da miotoxicidade da BthTX-I pelo soro antiofídico e rBaltMIP

Na atividade miotóxica realizada com a medição dos níveis de creatina cinase (CK) no plasma de camundongos pode-se observar que o soro antiofídico comercial de uso veterinário foi capaz de neutralizar parte da atividade miotóxica da peçonha de *Bothrops jararacussu* e de BthTX-I; enquanto que o inibidor rBaltMIP foi capaz de neutralizar a miotoxicidade desses compostos, de maneira estatisticamente significante e superior ao soro antiofídico ($p<0,05$) **(Fig.23)**. Notamos ainda que a complementação com o antisoro comercial teve um efeito sinérgico com a atividade do rBaltMIP evidenciando uma possível aplicação para esse inibidor **(Fig. 23).**

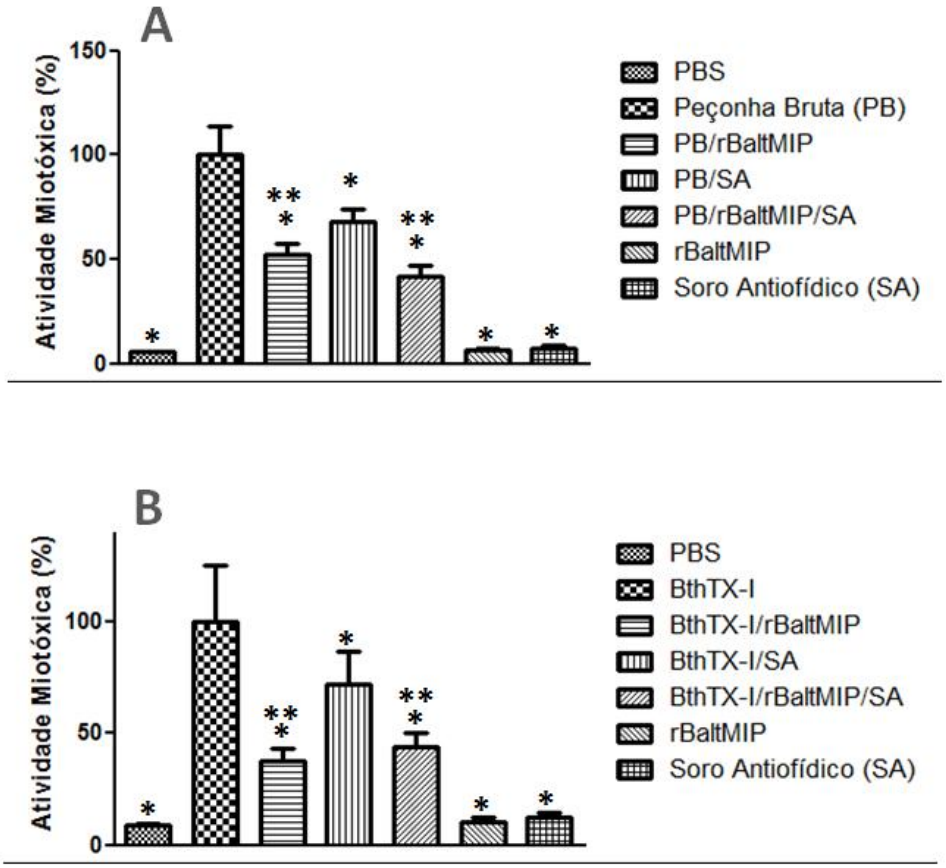


Figura 23. Neutralização da atividade miotóxica da miotoxina Lys49 PLA_2-símile BthTX-I e da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* com incubação prévia de 30 minutos. Neutralização da atividade miotóxica da miotoxina Lys49 PLA_2-símile BthTX-I e da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* por rBaltMIP, soro antiofídico veterinário e o soro antiofídico complementado com rBaltMIP. As amostras de BthTX-I e peçonha bruta foram previamente incubadas com rBaltMIP por 30 min à 37°C. Todas as amostras foram injetadas na proporção molar miotoxina/inibidor (1:1). A atividade total de cada miotoxina foi considerada como 100% de atividade. Resultados expressos como a média ±S.D. (n = 6) e os resultados estatisticamente significantes ($p<0,05$) foram marcados com *. (**) evidencia

uma diferença estatisticamente significante entre a inibição da atividade miotóxica do rBaltMIP e Soro/rBaltMIP frente á inibição do soro antiofídico.

Mais uma vez, com o objetivo de estudar o potencial do rBaltMIP em complementar a soroterapia convencionalmente utilizada, avaliamos as atividades miotóxicas da BthTX-I e da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* onde foram injetados os agentes miotóxicos (proteína e peçonha) e após 30 minutos foram inoculados os agentes neutralizantes soro antiofídico e rBaltMIP, sendo em seguida avaliadas suas inibições **(Fig.24).**

Nesta atividade, pode ser observado que, quando injetado 30 minutos após a BthTX-I, o rBaltMIP diminuiu drasticamente a atividade miotóxica dessa proteína, assim como o soro antiofídico, contudo, a solução complementada de anti-soro não foi estatisticamente maior que a atividade do próprio inibidor ou do próprio anti-soro. O mesmo pode ser visualizado para a peçonha bruta de *Bothrops jararacussu*, esse dado demonstra que, mesmo utilizando um soro antiofídico complementado, o tempo de administração deste é de fundamental importância para sua eficiência **(Fig.24)**.

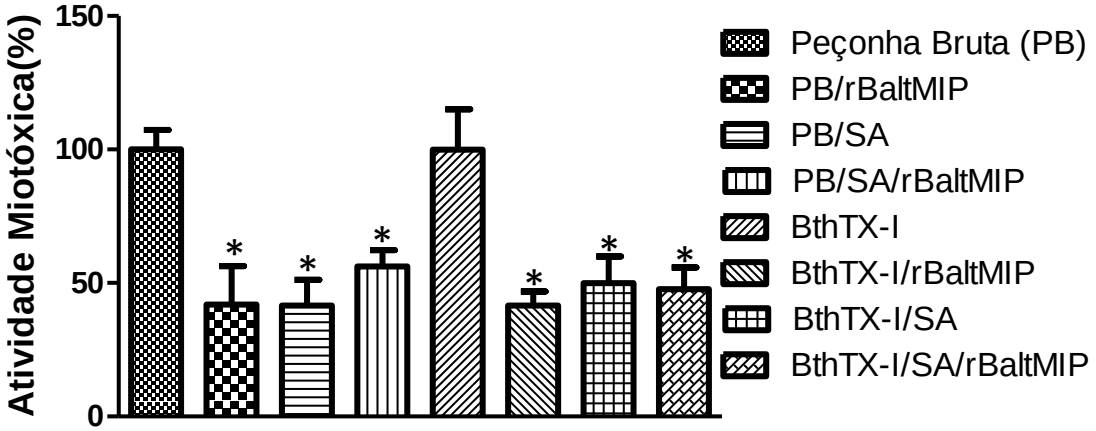


Figura 24. Neutralização da atividade miotóxica da miotoxina Lys49 PLA_2-símile BthTX-I e da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* sem incubação. Neutralização da atividade miotóxica da miotoxina Lys49 PLA_2-símile BthTX-I e da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* por rBaltMIP, soro antiofídico veterinário e o soro antiofídico complementado com rBaltMIP. As amostras de BthTX-I e peçonha bruta foram previamente aplicadas no músculo gastrocnêmio da pata direita dos camundongos, após 30 minutos amostras contendo rBaltMIP, soro antiofídico ou soro antiofídico complementado com rBaltMIP foram injetadas na proporção molar toxina/inibidor (1:1). A atividade total de cada toxina foi considerada como 100% de atividade. Resultados expressos como a média ±S.D. (n = 6) e os resultados estatisticamente significantes ($p<0,05$) foram marcados com *.

4.8.2. Análise histopatológica da neutralização da miotoxicidade da BthTX-I pelo soro antiofídico e rBaltMIP

A análise histopatológica demonstrou que tanto a BthTX-I, quanto a peçonha bruta de *B. jararacussu* foram capazes de induzir danos às fibras musculares dos animais, recrutando infiltrados leucocitários, formando intenso acúmulo de líquido intercelular **(Fig.25 A e B)** além de, a peçonha bruta, induziu uma intensa hemorragia, observada pela presença de grande quantidade de hemácias no músculo **(Fig.25 B).**

Observou-se também que a BthTX-I, sofreu uma diminuição da sua capacidade de dano local **(Fig.25 C)**, abservada pela manutenção da integridade das fibras musculares e pela diminuição do número de infiltrados leucocitários, observamos ainda que o rBaltMIP inibiu com maior intensidade a atividade miotóxica da BthTX-I quando comparado com o soro antiofídico.

Foi também injetada peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* sozinha ou previamente incubada com rBaltMIP, soro antiofídico e soro antiofídico complementado com rBaltMIP, no músculo gastrocnêmico de camundongos. Quando a peçonha bruta de *B. jararacussu* foi previamente incubada com rBaltMIP **(Fig.25 D)** foi observada uma maior preservação das fibras musculares e a diminuição de infiltrados contudo, ainda pode-se visualizar a presença de hemácias.

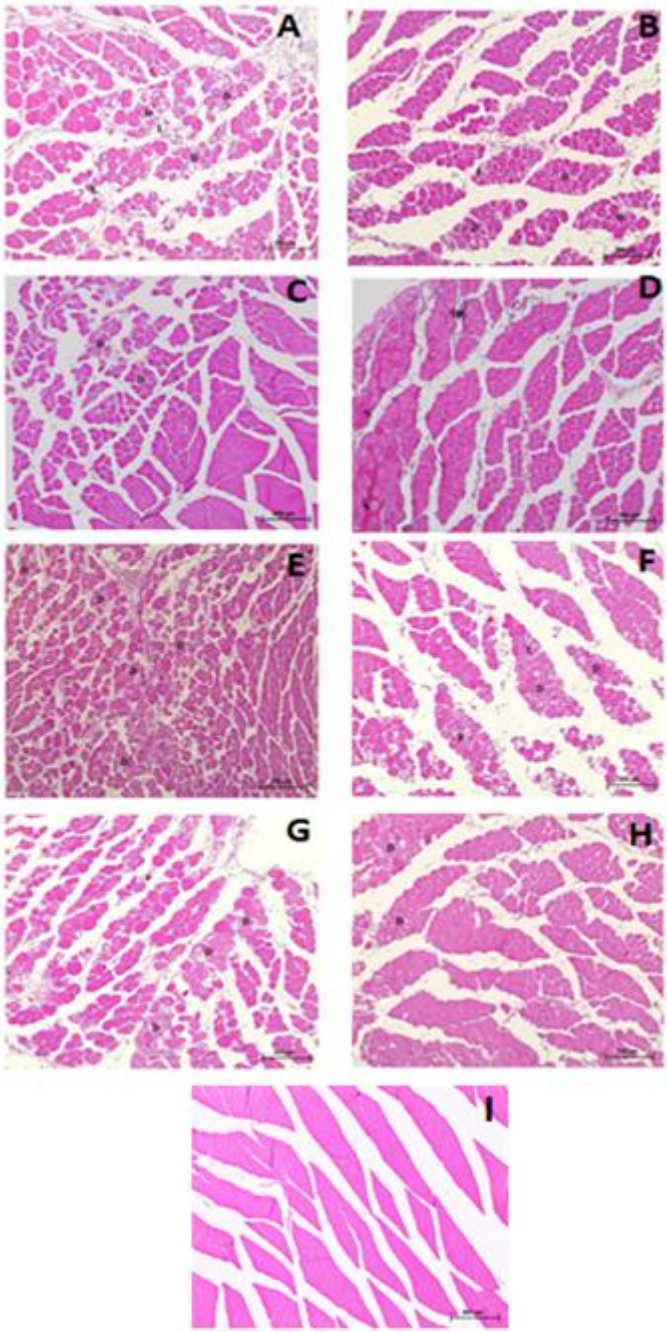


Figura 25. Avaliação da potencial complementação da soroterapia convencional com rBaltMIP pela análise histopatológica. Em experimento de neutralização da atividade miotóxica da miotoxina Lys49 PLA_2-símile BthTX-I e da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* com incubação prévia de 30 minutos (item 3.2.10.1.) foi feita a microscopia de luz de cortes advindos do músculo gastrocnêmio de camundongos que foram injetados com: (A) BthTX-I (50 µg), (B) Peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* (50 µg), (C) BthTX-I (50 µg) previamente incubado com rBaltMIP, na proporção 1:1 (M:M), **(D)** Peçonha bruta previamente incubada com rBaltMIP, **(E)** BthTX-I (50 µg) previamente incubado com soro antiofídico polivalente, **(F)** Peçonha bruta (50 µg) previamente incubada com soro antiofídico polivalente na proporção recomendada pelo fabricante, **(G)** BthTX-I (50 µg) previamente incubada com a solução de soro antiofídico complementada com rBaltMIP, **(H)** peçonha bruta (50 µg) previamente incubada com a solução de soro antiofídico complementada com rBaltMIP, **(I)** Controle negativo (PBS).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização bioquímica e funcional de um alfa inibidor de miotoxinas proveniente da serpente *Bothrops alternatus*, em sua forma recombinante. Para atender a este objetivo selecionamos a PLA_2 homóloga Lys49 BthTX-I e a PLA_2 Asp49 BthTX-II da peçonha de *B. jararacussu* para os estudos de neutralização das atividades edematogênica e miotóxica. Esta escolha se deu devido ao elevado conhecimento das mesmas em relação às suas características estruturais e atividades biológicas.

Inicialmente, procedeu-se ao isolamento das toxinas BthTX-I e BthTX-II, da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu* conforme descrito por Homsi-Brandeburgo et al. (1988) e Cintra et al. (1993). O isolamento da BthTX-I e II ocorreu através de dois passos cromatográficos a saber: 1) Cromatografia de exclusão molecular **(Fig.2A)** e troca iônica **(Fig.2B)**. Na primeira, foi feita a separação das proteínas da peçonha da serpente de acordo com os tamanhos das mesmas, tendo sido eluidas em 5 diferentes frações chamadas de P1, P2, P3, P4 e P5. No segundo passo o pool das proteínas eluidas na fração obtida, de número 4 do passo anterior, passou por uma troca iônica onde as proteínas foram separadas de acordo com suas cargas e afinidade entre íons da fase móvel e a matriz, controlados por fatores como pH e força iônica. Deste passo foram obtidas quatro frações chamadas de CM1, CM2, CM3 e CM4 **(Fig.2B)**, através da comparação da análise eletroforética em gel SDS-PAGE as frações CM2 e CM4 foram relacionadas às BthTX-II e BthTX-I, respectivamente, por apresentarem semelhanças em suas massas relativas. De acordo com Homsi-Brandeburgo et al. (1988), a BthTX-I representa aproximadamente 40% da fração número 4 (P4) da peçonha bruta de *B. jararacussu* e representando 15% do total de proteínas presentes neste veneno, já a BthTX-II tem representação de aproximadamente 20,4% e 7%, respectivamente.

Neste trabalho a purificação das toxinas BthTX-I e BthTX-II foi feita conforme descrito por Homsi-Brandeburgo et al. (1988) e Cintra et al. (1993), tendo sido feitas modificações como: na primeira etapa, utilizou-se a mesma resina porém fizemos a troca do tampão de eluição que inicialmente era formiato de amônia, pH 3,5 por Bicarbonato de amônia pH 8,0; na segunda etapa, que consiste da obtenção das bothropstoxinas utilizamos resina de troca catiônica fraca com tampão AMBIC pH 8,0 ao invés de uma troca catiônica forte com tampão acetato de amônia pH 5,0. Com as modificações utilizadas no nosso trabalho foi possível eluir a proteína de

interesse em uma concentração menor de sal evitando tratamentos drásticos para retirada do mesmo.

Foi utilizado como referência para as toxinas isoladas de *Bothrops jararacussu* as análises eletroforética e funcional (atividade fosfolipásica e miotóxica). A BthTX-I mostrou-se pura ao fim da segunda etapa cromatográfica (item 4.1.2.) enquanto a BthTX-II apresentou poucas impurezas após término deste passo cromatográfico, sendo obtida purificada após sua separação no terceira etapa cromatográfica com a utilização da fase reversa (**Fig. 3C).** Como mostram as **Figs. 3A** e **3C,** essas toxinas foram obtidas com alto grau de pureza, quando avaliadas por cromatografia de fase reversa e análise eletroforética, e ativas quando avaliada a atividade miotóxica para a BthTX-I e II (**Fig. 14**) e fosfolipásica para a BthTX-II (**Fig. 13**).

A primeira miotoxina com atividade fosfolipásica de uma serpente do gênero *Bothrops* foi a isolada de *B. asper* por Gutiérrez et al. (1984), cujo peso molecular estimado por gel filtração em Sephadex G 75 foi de 10.700. Analisando a literatura a respeito do isolamento e obtenção de proteínas com elevado estado de pureza, constatamos a necessidade da combinação de diferentes processos cromatográficos e mecanismos de separação para purificação de PLAs, miotoxinas, proteases e outras proteínas, a fim de serem utilizadas em sua caracterização funcional e bioquímica.

Quanto à caracterização bioquímica e estrutural da BthTX-I, Cintra et al. (1993) mostrou ser a BthTX-I uma miotoxina Lys49 PLA_2 homóloga através do alinhamento das sequências de seus peptídeos com os de outras PLA_2 e miotoxinas com estruturas de PLA_2 possuindo sequências semelhantes a outras PLA_2 como de *B. atrox* (MARAGANORE, 1984); *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (MARAGANORE & HEINRIKSON, 1990), *B. asper* (FRANCIS, 1991) e também à PLA_2 pancreática (FLEER, 1978). A BthTX-I é de uma proteína Lys49 PLA_2 homologa de 121 resíduos de aminoácidos, termoestável com pI 8,2, Mr de 13.700, cuja sequência do N-terminal é: SLFELGKMILGET e a sequência completa a seguinte:

Lys49-BthTX-I = SLFELGKMIL OETGKNPAKS –YGAYGCNCG VLGRGKPKDA TDRCCYVHKC CYK---KLTG C-----NPKK DRYSYSWKDK TIVC-GENNP CLKELCECDK AVAICLRENL GTYNKKYRYH LKPFC—KKA DPC

Embora sua sequência seja altamente homóloga a Asp49 PLA_2 ela apresenta mutações como: Leu5 - Phe5; Gln11 - X11; Asp28 - Tyr28; Leu32 - Gly32; Lys49 - Asp49 e Asp71 - Asn71, sendo especificamente a mutação do aminoácido Asp49 pelo Lys49 a responsável pela inatividade catalítica e proteolítica. Contudo esta mutação não interferiu no potencial miotóxico desta toxina, possuindo a BthTX-I um grande potencial de causar necrose muscular e sendo uma das maiores responsáveis pelos efeitos deletérios causados pela peçonha uma vez que está presente nesta em grande quantidade. Segundo estudos de Dijkstra et al. (1981 b.) feitos com a estrutura cristalina da PLA_2 pancreática bovina, o cálcio se estabiliza octaedricamente por sete ligantes de oxigênio (Tyr28, Gly30, Gly32, Asp49 e uma molécula de água) no sítio de ligação nas PLA_2s e a mudança do Asp49 pelo Lys49 interfere nesta ligação do cálcio ao sítio ativo inativando a atividade catalítica e assim a hidrólise dos fosfolipídeos, sugerindo que o mecanismo miotóxico seria independente da atividade catalítica. Vale lembrar que essas PLA_2s de *B. jararacussu* causam miotoxicidade sem, no entanto, haver hemorragia intramuscular, diferente de outras serpentes do gênero Bothrops, como a *B. jararaca* e *B. newiedi* (QUEIROZ, 1984) cujas toxinas causadoras da miotoxicidade são metaloproteases.

A BthTX-II é uma Asp49 PLA_2 composta por uma cadeia simples de polipeptideos de 120 resíduos de aminoácidos com Mr = 13.976 Da; 7 ligações dissulfeto (igual a BthTX-I) contendo uma metionina, 14 resíduos de cisteinas e sequência do N-terminal: DLWQWGQMILKETGKLPFPY YTTYGCYCGWGGR com sequência completa:

Asp49-BthTX-II = DLWQWGQKIL KETGKLPFPY YTTYGCYGCW
GGRGKPVDPTD RCCFVHDCCY KVTNYCPKKN DRYSYSRVSY
NYCRGGPCDE QICECDKAIA VCFRENLGTY NKKAYYHLKP FCKEPAETC

Possui atividade catalítica baixa e está ligada de alguma forma ao sítio de ligação do Ca^{2+} composto por resíduos de Tyr28, Gly30, Gly32, His48, Tyr52, Asp99 e especialmente a Asp49. Como outras PLA_2 , a bothrostoxina II possui Thr112 e Tyr113 além de 3 Tyr entre os residuos 112 e 121, sendo a atividade miotóxica provavelmente decorrente da sequência entre esses resíduos, os quais apresentam elevada homologia estrutural com outras miotoxinas (PEREIRA, 1998; FRANCIS et al., 1991).

Várias PLAs provenientes de peçonhas botrópicas têm sido purificadas através da utilização de uma combinação de métodos cromatográficos, tais como: exclusão molecular, troca iônica, RP-HPLC, interação hidrofóbica e colunas de afinidade contendo ligantes naturais como heparina ou anticorpos (GUTIÉRREZ, LOMONTE, 1997; GEOGHEGAN et al.,1999; OWNBY et al., 1999; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2007; COSTA et al., 2008; CALGAROTTO et al., 2008).

Kinkawa (2010) e Lizano (2003) sugeriram que serpentes peçonhentas tenham desenvolvido um sistema de autoproteção contra seu próprio veneno sendo a expressão desses componentes autorregulados pelos próprios componentes do veneno, sendo proteínas oligoméricas, geralmente ácidas e com massa molecular entre 18.000 e 75.000 Da formadas por subunidades com tamanhos entre 20.000 e 50.000 Da. Vários α-PLIs foram purificados de uma variedade de serpentes, como, por exemplo, o PLI purificado do plasma da serpente *Trimeresurus flavoviridis*, através de uma combinação de coluna de gel filtração Sephadex G-200, troca iônica DEAE-celulose e Blue-Sepharose CL-6B (KOGAKI et al., 1989). O inibidor purificado apresentou-se como uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 100.000, o qual consiste em 4 subunidades monoméricas não homólogas de aproximadamente 20.000 - 24.000. No referido trabalho, foi testada a capacidade desse inibidor de interagir com as fosfolipases A_2 das peçonhas de *T. flavoviridis* e *Agkistrodon halys blomhoffii*, além da enzima pancreática suína e da fosfolipase C de *Bacillus cereus*. Todos esses testes foram realizados na presença e ausência de Ca^{2+}. Segundo Kogaki e colaboradores (1989) este inibidor apresentou especificidade pela PLA_2 de *T. flavoviridis*, além de uma atividade inibitória independente de íons Ca^{2+}.

Ohkura e colaboradores (1993) purificaram um alfa inibidor do plasma da serpente *Agkistrodon blomhoffii siniticus*, através de um método semelhante ao anterior. Neste caso, a purificação deste PLI foi realizada por cromatografias sequenciais em colunas Sephadex G-200, Mono Q e Blue-Sepharose CL-6B. O PLI purificado mostrou-se como uma glicoproteína de massa molecular aparente de 75.000 Da para o trímero e 24.000 Da para o monômero. O PLI de *A. blomhoffii siniticus* se diferenciou do PLI proveniente de *T. flavoviridis* pelo fato de ser um homodímero, apesar da grande semelhança em relação às propriedades inibitórias. Outros αPLIs foram purificados a partir dos plasmas das serpentes *Atropoides nummifer* (QUIRÓS et al., 2007) e *Protobothrops flavoviridis* (SHIMADA et al., 2008),

sendo todos glicoproteínas ácidas com tendência à formação de polímeros a partir de monômeros, com peso molecular entre 20.000 - 24.000.

Quanto às serpentes do gênero *Bothrops*, outros α inibidores foram purificados, como por exemplo, BaMIP, um PLI purificado a partir do plasma da serpente *Bothrops asper* (LIZANO et al., 1997) por cromatografia de afinidade com miotoxinas imobilizadas em resina Sepharose 4B CNBr-activada. O BaMIP apresentou monômeros com peso molecular de aproximadamente 24.000 e ponto isoelétrico 4, sítio de glicosilação e uma estrutura, em solução, composta por cinco subunidades, após eluição em gel filtração. O BaMIP apresentou inibição sobre atividade miotóxica, edematogênica e citolítica das miotoxinas I e III da serpente *B. asper*. Estudos estruturais demonstraram também que BaMIP, assim como todos os inibidores de fosfolipase A_2 da classe α, possui um domínio homólogo ao CRD de lectinas tipo C. Outro inibidor purificado de serpente é o CgMIP-II, um αPLI purificado do plasma da serpente *Cerrophidion (Bothrops) godmani* (LIZANO et al., 2000) por coluna de afinidade contendo miotoxinas. O inibidor é uma proteína ácida (pI 4), glicosilada com subunidades monoméricas com massa molecular entre 20.000 - 25.000, formando um polímero de aproximadamente 180.000.

Soares e colaboradores (2003) purificaram uma proteína que neutraliza a atividade enzimática, tóxica e farmacológica de uma variedade de toxinas (ácidas ou básicas) de diferentes peçonhas. Este inibidor, denominado de BmjMIP, foi isolado a partir do plasma da serpente *Bothrops moojeni*, por cromatografia de afinidade. BmjMIP apresentou características bioquímicas e estruturais semelhantes às já descritas para os αPLIs, além de ser estável em grande faixa de pH e temperatura.

Oliveira e colaboradores (2008) também purificaram um αPLI do plasma da serpente *Bothrops jararacussu* por cromatografia de afinidade através da imobilização com a toxina BthTX-I em gel Sepharose. Este inibidor, nomeado αBjussuMIP, apresentou características bioquímicas e atividades semelhantes aos αPLIs, sendo uma glicoproteina oligomérica com subunidade monomérica de Mr 24 000 e estável em pH 6 - 12 e temperaturas de 0 ^{0} – 80 ^{0}C, possuindo um potencial de neutralizar atividades miotóxicas, edematogênica, bactericida, citotóxica e enzimática de algumas $svPLA_2$.

Embora extensos estudos tenham sido feitos purificando PLIs das peçonhas de serpentes suas obtenções esbarram em obstáculos que algumas vezes limitam ou dificultam as pesquisas de suas atividades funcionais, bioquímicas e estruturais. Podemos citar como exemplo a baixa disponibilidade destes inibidores presentes

nos soros/plasmas, bem como a dificuldade de obtenção, extração e purificação destes, tornando as pesquisas dispendiosas e demoradas devido aos passos cromatográficos necessários para conseguir a proteína de interesse na sua forma pura e ativa, tendo ainda baixo rendimento e perdas decorrentes dos processos. Vale também lembrar, que a obtenção de PLIs a partir de plasmas ou soros esbarra em questões éticas e ambientais, uma vez que para obtê-los é necessário o sacrifício da serpente, diferentemente das toxinas presentes em suas peçonhas cuja extração é feita facilmente e sem a necessidade de sacrificar o animal.

A clonagem e expressão de proteínas tem sido um recurso bastante utilizado atualmente na produção de biomoléculas aplicáveis em diversas áreas da saúde e da pesquisa tanto nas básicas quanto em indústrias farmacêuticas como, por exemplo, a produção de insulina, hormônio de crescimento, dentre outros. Diante das dificuldades apontadas na obtenção de PLIs, após purificarem e caracterizarem os inibidores nativos de serpentes, como uma forma de contornar esses obstáculos, pesquisadores partiram então para a clonagem e expressão heteróloga de PLIs através de técnicas de biologia molecular. Este fato trouxe grande contribuição para os estudos desses inibidores, pois foram sanadas algumas das limitações encontradas na obtenção dos PLIs nativos como, por exemplo, as quantidades obtidas, a necessidade de vários passos cromatográficos para purificar a proteína de interesse dentro do pool de proteínas presentes no plasma das serpentes, os custos deste processo e também a questão ambiental, pois assim, a partir da expressão recombinante de inibidores de svPLA_2s, pode-se obter o inibidor purificado e ativo com apenas um ou dois passos cromatográficos. A expressão heteróloga ainda permite a aquisição do PLI em maior quantidade permitindo explorar uma elevada gama de ensaios laboratoriais *"in vivo"* e *"in vitro"* sem ser necessário o sacrifício da serpente. Futuramente ainda, torna-se viável pensar em produção em larga escala dessas potenciais enzimas e proteínas neutralizadoras de toxinas explorando seus efeitos farmacológicos e biotecnológicos.

Nesta direção, Santos-Filho et al. (2011; 2014) após ter isolado, caracterizado e clonado um inibidor de fosfolipase A_2 miotóxica do tipo alfa (α-BaltMIP) do plasma da serpente *B. alternatus,* promoveu a expressão heteróloga deste inibidor em *P.pastoris* sendo chamado de rBaltMIP, apresentando este 100% de identidade sequencial da região N-terminal com o inibidor nativo. Além disso, em sua tese de doutorado, Santos-Filho mostrou que o rBaltMIP foi capaz de diminuir parcialmente a atividade fosfolipásica de diferentes PLA_2s Asp49 (BthTX-II, PrTX-III,

BthA-I-PLA_2 e CB) e atividade citotóxica das toxinas Asp49 PLA_2s (BthTX-II, PrTX-III), e Lys49 PLA_2s (BthTX-I, PrTX-I), o que mostrou o grande sucesso da expressão heteróloga dessa proteína, sendo obtida com alto grau de pureza e na forma ativa. Em seu trabalho, Santos-Filho et al. (2014) utilizaram como sistema de expressão leveduras *Pichia pastoris*, as quais têm vantagens sobre outros sistemas de expressão por serem microorganismos eucariontes de fácil manipulação, capazes de promover modificações pós-traducionais, como formação de pontes dissulfeto, adição de lipídeos e N- e O-glicosilação. Além disso, as leveduras têm outras vantagens sobre sistemas procariontes, como a ausência de necessidade de se renovelar quimicamente a proteína de interesse, diminuindo assim a possibilidade de erros na expressão das macromoléculas (CREGG et al., 2009; CEREGHINO & CREGG, 2000; SELISTRE de ARAÚJO; FERREIRA de SOUZA, 2007; DALY & HEARN, 2005).

De acordo com Selistre de Araujo e Ferreira de Souza (2007) o uso da levedura *Pichia pastoris* é importante quando se objetiva moléculas secretadas e em grande quantidade. Essas leveduras apresentam genética e fisiologia conhecidas e são capazes de crescerem em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono, apresentam uma cauda de histidina a qual permite sua purificação através de uma coluna de níquel-sepharose e um promotor de transcrição de genes heterólogos AOX1 (gene codificante da enzima álcool oxidase) o que permite a geração de quantidades elevadas de proteínas, viabilizando inclusive a produção em escala industrial (gramas/litro) e com menor custo.

No presente trabalho foi feita a indução da expressão do Inibidor recombinante rBaltMIP conforme descrito por Santos-Filho (2011) e Santos-Filho e colaboradores (2014), sendo também feita sua caracterização bioquímica e funcional.

Primeiramente, foi feita a indução da expressão do rBaltMIP e sua purificação em coluna de níquel-sepharose, em seguida ele foi submetido à uma cromatografia líquida de alta performance (HPLC), na qual foi observada no cromatograma algumas impurezas do processo de expressão **(Fig.4B)**. A fração referente ao pico com tempo de retenção próximo a 32 minutos (esperado pelo inibidor) foi separado, liofilizado e estocado para uso nos experimentos de inibição. Com o intuito de confirmar o grau de pureza da proteína uma alíquota da fração do rBaltMIP separada do HPLC foi recromatografada na mesma coluna e com as mesmas condições mostrando-se um pico homogêneo no cromatograma. O inibidor

isolado apresentou-se como uma proteína altamente pura, tanto em HPLC quanto em SDS-PAGE, consistindo de uma cadeia polipeptídica simples com massa molecular relativa de 21 kDa **(Fig.4C)**, resultado próximo ao obtido por Santos-Filho (2011) em sua tese de doutorado, cuja massa relativa calculada através da eletroforese em SDS-PAGE foi de 24 kDa. A diferença entre as massas relativas observadas podem ser explicadas pela falta de precisão desta metodologia.

Após a purificação do inibidor foram realizadas a sua caracterização bioquímica e de suas atividades inibitórias. O espectros de massa intacta do inibidor recombinante por Maldi TOF/TOF modo linear indicou a massa molecular de 19.572,99 m/z **(Fig.6),** um pouco diferente da massa obtida por SDS-PAGE de 21 KDa **(Fig.5).** Esta diferença pode ser explicada pelo grau de precisão de cada metodologia sendo a técnica por espectrometria de massas a mais adequada e precisa para esta determinação. Comparando novamente com os PLIs αBjussuMIP e BaMIP, no inibidor recombinante αBaltMIP encontramos outras características similares a eles como massa relativa, onde para ambos os inibidores foram encontradas massas de 24.000 Da, próximas aos 21.000 Da encontrados para o rBaltMIP.

Para a caracterização bioquímica do inibidor, este foi inicialmente deglicosilado com uso de PNGase (enzima que remove o açúcar da molécula de proteína) e em seguida submetido à eletroforese em SDS-PAGE **(Fig.5).** O inibidor deglicosilado apresentou uma massa molecular relativa de 18,8 kDa enquanto que o nativo de 21 kDa sendo o conteúdo de carboidrato determinado através da massa molecular relativa de 10% **(Fig.7**). O espectro de massa intacta do D-rBaltMIP também foi feito por Maldi TOF/TOF modo linear o qual indicou a massa molecular de 17.538,39 Da **(Fig.8)** quando comparada com a massa intacta do G-rBaltMIP (19.573 Da) **(Fig.6)** indicou a mesma proporção de carboidratos sugerida no método anterior. Esta diferença da massa obtida por SDS-PAGE e MALD TOF/TOF pode ser explicada pelo grau de precisão de cada metodologia sendo a técnica por espectrometria de massa a mais adequada e precisa para esta determinação, porém, embora as técnicas possuam diferentes precisões ambas mostraram um conteúdo de carboidrato de 10%. Com relação a outros inibidores de PLA_2 de serpentes do tipo alfa, embora poucos trabalhos mostrem a relação da glicosilação com as atividades neutralizantes, aparentemente para este tipo de inibidor a deglicosilação não interfere na ação antimiotóxica e antiedematogênica. Podemos sugerir que a porcentagem do conteúdo de carboidrato desses alfa inibidores seja

variável ao compararmos por exemplo, com outros inibidores de fosfolipases miotóxicas com o inibidor da serpente *B. jararacussu* - αBjussuMIP, cuja massa relativa encontrada foi de aproximadamente 24.000 Da e quando deglicosilado sua massa foi de 18.000 Da (OLIVEIRA, 2008) e o DM64, proteína presente em soro de gambás (*D. marsupialis*) com massa molecular de 63.659 Da com conteúdo de carboidratos de 15% determinado por SDS-PAGE (ROCHA, 2002), sendo esta a primeira proteína antimiotóxica purificada de um mamífero.

Na tentativa de se obter características estruturais do inibidor αBaltMIP, Santos-Filhos (2011) fez vários modelos teóricos de sua estrutura tridimensional construídos utilizando-se de técnicas de modelagem molecular . Após simulação de dinâmica molecular (MD), a representação do modelo teórico final obtido do αBaltMIP apresentou as duas das principais características estruturais dos αPLIs: o "pescoço" α-hélice e o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) correspondente aos resíduos 11-37 e 49-143, respectivamente; e a região responsável pela glicosilação da amostra (Asn103), características preservadas em todas as sequências de αPLI de serpentes. A partir das conclusões obtidas com os resultados da modelagem molecular do αBaltMIP e com base na literatura, a qual afirma que os alfa inibidores de PLA_2 comportam-se como trímeros em solução, Santos-Filho sugeriu a capacidade de oligomerização deste inibidor.

No presente trabalho foi feita a confirmação da oligomerização do rBaltMIP com a determinação de sua massa molecular calculada através da uma curva de calibração logarítmica entre o coeficiente de partição (K_{av}) da proteína de interesse com os valores dos padrões conhecidos, onde o valor do K_{av} foi calculado através do seu volume de eluição em cromatografia de gel filtração com coluna Superdex 200 em FPLC. A massa molecular relativa encontrada para o oligômero do rBaltMIP foi de 77 kDa (**Fig.9)**, que similar as Mr encontradas para outros inibidores do tipo alfa e que também formam trímeros, como os inibidores das serpentes *Trimeresurus flavoviridis e Agkistrodon b. siniticus,* que possuem Mr de *75 kDa e* 3 unidades monoméricas (NOBUHISA, 1997; OKHURA, 1993). No entanto, embora a Mr encontrada para o oligômero através da cromatografia de gel filtração (77.000 Da) quando comparada às massas relativas encontradas para seu monômero em SDS-PAGE (21.000 Da) e massa intacta por MALD TOF/TOF (19.500 Da) possa sugerir ser este inibidor um tetrâmero, reforçamos a possibilidade dele ser um trímero em solução por ser este um comportamento característico dos inibidores tipo alfa e

também pela simulação de dinâmica molecular (MD) feita por Santos-Filho para o inibidor nativo αBaltMIP.

O rBaltMIP apresentou ponto isoelétrico de aproximadamente 5,8 **(Fig.10)**, o que demonstra que o rBaltMIP é uma proteína ácida, corroborando com os alfa PLIs já descritos na literatura até o momento (KINKAWA, 2010) como por exemplo, os inibidores de *B. jararacussu* (αBjussuMIP) e *B. asper* (BaMIP), cujos pI encontrados foram 5,0 e 4,0, respectivamente (OLIVEIRA, 2008; LIZANO, 1997). Podemos ainda observar a semelhança com o alfa inibidor DM64, encontrado em mamífero *D. marsupialis,* cujo pI é 4,5, reforçando assim a característica ácida dos alfa inibidores de PLA_{2s} miotóxicas.

Após hidrólise e sequenciamento dos peptídeos trípticos (**Tabela 3)** obtidos da hidrólise do inibidor recombinante, utilizamos a ferramenta CLUSTAL 2.1 para determinar o alinhamento das sequências dos peptídeos trípticos do inibidor recombinante (rBaltMIP) - obtidos através de análise de espectrometria de massa (Mascot version, 2.4.1) - com a sequência de cDNA predito e aminoácidos do inibidor nativo purificado do plasma de *B.alternatus (*αBaltMIP) (Santos-Filho, 2011) (**Fig.11)** e com outros inibidores de serpentes como mostra a **Fig.12**. Foi obtido 100% de similaridade entre os peptídeos deduzidos do rBaltMIP quando comparados aos do inibidor nativo αBaltMIP de *B.alternatus* (Santos-Filho, 2011) - mostrando a alta eficiência da expressão do inibidor recombinante - e também alta similaridade (92 - 96%) entre os peptídeos quando comparados com outros inibidores cujas sequências estão descritas na literatura. O grau de similaridade encontrado de 92% - 96% entre os peptídeos do rBaltMIP e as sequências de outros inibidores foi considerado elevado, por exemplo para o inibidor αBjussuMIP de *B.jararacussu*, Oliveira et al. (2008) encontrou similaridade entre as sequências de 73-92%.

Devido à grande variedade de proteínas e enzimas presentes nas peçonhas, o envenenamento bothrópico causa diversas sintomatologias e em conjunto causam efeitos bastante pronunciados e debilitantes. Assim, após a picada, o indivíduo apresenta sintomas de efeitos locais como inflamação aguda, distúrbios na coagulação e hemorragias generalizadas, no entanto, os efeitos mais severos e muitas vezes irreversíveis são os miotóxicos podendo levar a sequelas graves, como a perda permanente de tecido e incapacidade ou amputação do membro (JÚNIOR et al., 1997; OTERO et al., 2002; GUTIÉRREZ, 1995), a formação de edema também é

característica neste tipo de envenenamento e pode estar relacionada à inflamação ou a ação das miotoxinas e a liberação de proteínas creatina-quinase muscular.

A mionecrose é ocasionada principalmente pelas ações das miotoxinas Asp49 e Lys49 sobre o músculo esquelético, que após sua injeção leva a uma grande liberação de proteínas creatina-quinase muscular ocasionando uma perda permanente do tecido e da habilidade do membro atingido deixando grandes sequelas (NISHIOKA, 1992; GUTIÉRREZ, 1995).

No presente trabalho e como esperado, foi observado um maior potencial de degradação muscular nos animais que receberam em seu músculo gastrocnêmio a injeção de 5,0 µg de BthTX-I (1.687 U/L de CK) quando comparado com os animais que receberam a mesma quantidade da BthTX-II (1.031 U/L de CK) **(Fig.14)**. Desta forma esses resultados corroboraram com dados da literatura mostrando que dentre as PLA_2s estudadas do gênero *Bothrops,* embora as Asp49 PLA_2 possuam atividade catalítica e as Lys49 PLA_2 sejam cataliticamente inativas, ambas toxinas apresentam ação miotóxica através de mecanismos distintos sendo maior a ação necrosante sobre o músculo esquelético da BthTX-I (CINTRA et al.,1993; HOMSI-BRANDEBURGO et al.,1988).

Nos experimentos de miotoxicidade da toxina BthTX-I **(Fig.15A)** observou-se que o grupo controle, que recebeu injeção de 50 µL de PBS, apresentou CK = 201 U/L e à medida que se aumentou a concentração da toxina (0,05; 0,1; 0,2 e 0,4 µg/µL) houve aumento da atividade de CK sendo que este, foi proporcional ao aumento da concentração. Observa-se também que a partir da concentração de 0,4 µg/µL atingimos um platô, onde a indução da miotoxicidade é máxima e se mantém praticamente constante, mesmo com o aumento da concentração da toxina injetada (até 0,8 µg/µL). Nos experimentos de miotoxicidade da toxina BthTX-II **(Fig.15B),** o grupo controle, que recebeu injeção de 50 µL de PBS, apresentou CK = 239 U/L e à medida que aumentou-se a concentração da toxina (0,05; 0,1; 0,2: 0,4 e 0,8 µg/µL) houve aumento da atividade de CK, sendo que este foi proporcional ao aumento da concentração. Observa-se também que a partir da concentração de 0,8 µg/µL atingiu-se um platô, onde a indução da miotoxicidade é máxima e se mantém praticamente constante, mesmo com o aumento da concentração da toxina injetada (até 1,6 µg/µL).

A concentração miotóxica efetiva (CE50), dose que causa 50% de miotoxicidade, foi de 0,1256 µg/µL para a BthTX-I **(Fig.15A)** e de 0,6183 µg/µL para a BthTX-II **(Fig.15B)** demonstrando que a BthTX-I foi mais miotóxica que a BthTX-II

(PLA_2 Asp49). Para os experimentos de inibição da atividade miotóxica da BthTX-I **(Fig.17A)** foram utilizados 0,2512 µg/µL da miotoxina (concentração referente à duas CE50 - 0,1256 µg/µL - que produziu a indução máxima de miotoxicidade) e inibidor em diferentes razões molares (mol/mol) 1:1 e 1:2 sendo observadas inibições da miotoxicidade da BthTX-I pelo rBaltMIP de 53% e 62%, respectivamente. Já nos experimentos de inibição da atividade miotóxica da BthTX-II **(Fig.17B)** foram utilizados 1,23 µg/µL da miotoxina (concentração referente à duas CE50 - 0,6183 µg/µL - que produziu a indução máxima de miotoxicidade) e inibidor em diferentes razões molares (mol/mol) 1:1 e 1:2 e foram observadas inibições de 55% e 57% da miotoxicidade da BthTX-II pelo rBaltMIP, respectivamente.

O rBaltMIP foi capaz de inibir a atividade miotóxica tanto da PLA_2 homóloga Lys49 BthTX-I quanto da PLA_2 Asp49 BthTX-II, sugerindo que podem haver várias formas de inibição desta atividade. Embora a hipótese para a inibição da miotoxicidade da Lys49 BthTX-I pareça ser provavelmente através da atuação do inibidor na sua região C-terminal, a participação de outras regiões da proteína em seu mecanismo miotóxico não pode ser excluída. No caso da inibição da atividade miotóxica induzida pela Asp49 BthTX-II, o rBaltMIP provavelmente atuou neutralizando, pelo menos em parte, a atividade enzimática desta toxina sobre os fosfolipídios de membrana, possível mecanismo pelo qual esta toxina produz dano ao músculo esquelético. Assim como para a BthTX-I, a BthTX-II pode ter diferentes regiões da molécula responsáveis pela atividade miotóxica, e consequentemente, possíveis alvos para o rBaltMIP atuar, como por exemplo os receptores de membranas acoplados ao armazenamento intracelular de Ca^{2+}, como sugerido por Cintra-Francischinelli et al. (2010), uma vez que mesmo com a formação do complexo inibidor-toxina ainda foi observada atividade miotóxica nas duas miotoxinas testadas.

Nos trabalhos de Oliveira (2008) e Santos-Filho (2011) desenvolvidos com inibidores nativos de serpentes *B.jararacussu* e *B. alternatus* (αBjussuMIP e αBaltMIP), respectivamente, o primeiro obteve cerca de até 90% de inibição da miotoxicidade da BthTX-I e cerca de 60% da BthTX-II; enquanto que Santos-Filho (2011) obteve para essas mesmas toxinas, inibições de até 65% e 50%, respectivamente. Nos referidos trabalhos ainda com relação à neutralização da miotoxicidade, ambos observaram uma maior inibição da atividade miotóxica também para outra toxina PLA_2-homóloga Lys49 PrTX-I quando comparada com a PLA_2 Asp49 PrTX-II, corroborando com dados da literatura que sugerem ser os alfa

inibidores de serpentes mais específicos para as toxinas PLA_2-homólogas Lys49. Contrariamente aos inibidores de PLA_2 do tipo α, os inibidores do tipo γ, mostraram-se mais específicos em inibir a miotoxicidade produzida por PLA_2 Asp49, como foi observado no γBjussuMIP (OLIVEIRA, 2011).

Rocha (2002) em seu trabalho com uma proteína antimiotóxica (DM64) de *D. marsupialis* também encontrou alto potencial de inibição (cerca de 80%) para as ações miotóxicas de duas toxinas de *B. asper:* Asp49 mt-I e Lys49 mt-II. Ele especula que este inibidor do tipo alfa DM64 se liga a miotoxinas formando complexos através de sítios miotóxicos distintos dos sítios responsáveis pela atividade catalítica, sendo o mesmo sítio responsável pela inibição da miotoxicidade pela heparina (GUTIÉRREZ, 1995), sugerindo que para a toxina Lys49 mt-II de *B. asper*, da mesma forma que para a $LysPLA_2$ de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (NUÑEZ, 2001), utilize para exercer a atividade um domínio citosólico de ligação à heparina localizado na região C-terminal.

No presente trabalho foi demonstrada a atividade edematogênica das PLA_2s BthTX-I e BthTX-II de *B. jararacussu* **(Fig.16 A e B).** A BthTX-I (PLA_2Lys49) apresentou indução de edema em baixas concentrações atingindo um platô a partir da concentração de 0,25 µg/µL onde a indução de edema é máxima e se manteve praticamente constante, mesmo com o aumento da concentração da toxina injetada **(Fig.16A).** Após 30 minutos observou-se que o grupo controle, que recebeu injeção subplantar de 50 µL de PBS, apresentou um pequeno aumento da pata, cerca de 27%. Diferentemente da BthTX-I, a BthTX-II **(Fig.16B)** apresentou em baixas concentrações (0,0078 µg/µL) 56% de aumento da pata em relação ao tamanho inicial. O mesmo comportamento foi apresentado pela BthTX-I com exceção que esta não apresentou indução de edema em baixas concentrações. A concentração edematogência efetiva (CE50), concentração que causa 50% de edema, foi de 0,02581 µg/µL para a BthTX-I **(Fig.16A)** e de 0,02810 µg/µL para a BthTX-II **(Fig.16B)** demonstrando que a BthTX-I foi mais edematogência que a BthTX-II.

Em seguida foram feitos experimentos onde avaliamos o potencial do inibidor recombinante expresso, rBaltMIP, de inibir a atividade edematogênica tanto para a BthTX-I **(Fig.18A)** quanto para a BthTX-II **(Fig.18B**). Após determinação das CE50 que causam edema nos animais, respectivamente **Fig.16A e Fig.16B,** utilizamos para os experimentos de inibição desta atividade, concentração das toxinas referente a duas vezes a CE50, a fim de garantir a indução máxima de edema, e a partir dessas concentrações foram calculadas para o inibidor as razões

molares entre 2 x CE50 das toxinas e a concentração a ser utilizada do rBaltMIP (mol/mol), sendo elas: 1:2 e 1:7, incubadas a 37ºC por 30 minutos, antes da injeção subplantar.

Desta forma, a concentração usada nos experimentos de inibição da atividade edematogênica da toxina BthTX-I **(Fig.18A)** foi de 0,05162 µg/µL de miotoxina em solução com 50 µL de PBS sendo injetado na pata uma massa final equivalente à 2,58 µg, enquanto que para a BthTX-II a concentração equivalente à 2 x a CE50 foi de 0,0562 µg/µL **(Fig.18B)** de miotoxina em solução com 50 µL de PBS equivalente à injeção de 2,81 µg da toxina na pata do animal. O inibidor recombinante do tipo alfa nas razões molares acima descritas na presença da BthTX-I, apresentou inibição estatisticamente significativa do edema de 17% e 20%, respectivamente, quando comparado com a atividade edematogênica total desta toxina em que a indução de edema foi de 100% **(Fig.18A)**. Para a toxina BthTX-II, foi observada uma diminuição do edema quando injetada a solução BthTX-II/rBaltMIP na razão molar 1:2 e 1:7 de aproximadamente 20% e 40%, respectivamente **(Fig.18B)**.

Interessante observar que, embora a miotoxina PLA_2-homóloga Lys49-BthTX-I tenha se apresentado mais edematogênica que a PLA_2 Asp49 BthTX-II, aquela foi a que obteve menor neutralização da sua atividade pelo inibidor recombinante do tipo alfa de *B.alternatus* (rBaltMIP), diferente do que aconteceu com o αPLI nativo de *B.jararacussu* (αBjussuMIP) descrito por Oliveira et al. (2008), em cujo trabalho observou uma maior inibição da atividade edematogênica nas toxinas (25 µg) do tipo Lys49 (aproximadamente 85%), dentre elas a BthTX-I, quando comparadas com as Asp49 (aproximadamente 45%), dentre elas a BthTX-II. Lizano (1997) também encontrou elevada redução na atividade edematogênica promovida pelo inibidor BaMIP de *B. asper* nas miotoxinas I e III (Asp49) e II e IV (Lys49), sendo 81,6; 82,5%; 98,2e 86%, respectivamente. A maior neutralização da atividade edematogênica para a PLA_2 Asp49 BthTX-II encontrada no presente trabalho quando comparada aos trabalhos de Oliveira e Lizano, que obtiveram maior neutralização das PLA_2 Lys49, pode ser explicada talvez pela distintas propriedades entre os três inibidores: rBaltMIP, αBjussuMIP e BaMIP, que embora sejam alfa inibidores, ainda possuem mecanismos de ação pouco esclarecidos.

Assim, uma vez que um dos mecanismos prováveis de indução do edema seja pela reação inflamatória através da hidrólise de fosfolipídeos de membrana por toxinas da peçonha com consequente formação de prostaglandinas (PGs),

tromboxanos e leucotrienos, a maior neutralização do edema promovido pela PLA_2 Asp49 BthTX-II talvez possa ser decorrente do fato desta toxina possuir atividade catalítica sob estes fosfolipídeos e do rBaltMIP ter neutralizado a reação inflamatória induzida via algum desses mediadores. Por outro lado, a inibição da atividade edematogênica pelo rBaltMIP sobre a Lys49 BthTX-I, possa ocorrer provavelmente devido à neutralização ou diminuição do influxo leucocitátio que esta ocasiona no local atingido, uma vez que esta toxina não possui ação catalítica.

Tendo em vista o potencial neutralizante do rBaltMIP diante de atividades tóxicas de proteínas e enzimas presentes nas peçonhas de serpentes podendo este vir a ser útil no futuro na toxicologia dos envenenamentos, foi avaliado o potencial imunogênico deste inibidor recombinante afim de sugerir preliminarmente a viabilidade de sua utilização como complemento à soroterapia atualmente usada no tratamento de acidentes ofídicos. Para complementar estes dados foi comparada a neutralização da atividade miotóxica da BthTX-I pelo soro antiofídico e rBaltMIP através da medição dos níveis de creatina cinase (CK) **(Fig.24)** e da análise histopatológica das fibras musculares **(Fig.25).**

Ademais, para a avaliação do potencial imunogênico do rBaltMIP foram feitas imunizações sucessivas de animais para a obtenção de anticorpos policlonais anti-rBaltMIP, cuja detecção foi feita por ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) **(Fig.20)**. Em seguida foi avaliada a especificidade do rBaltMIP com a BthTX-I **(Fig.20),** onde os resultados dos testes de ELISA mostraram que os anticorpos anti-rBaltMIP se ligaram apenas ao seu antígeno rBaltMIP e a este quando complexado à toxina BthTX-I, não sendo observada reatividade quando na presença apenas da toxinas ou BSA, quando usados como *coating.* Verifica-se também, que o soro pré-imune não contém anticorpos, uma vez que não mostrou reatividade mesmo quando na presença da toxina complexada com o inibidor. Para reforçar este resultado, no *Western Blotting* foi possível constatar o reconhecimento específico dos anticorpos contra o inibidor (**Fig.21)**.

Finalmente, através do ensaio de ELISA não foi observada indução da produção de anticorpos anti-rBaltMIP quando o inibidor foi usado como tratamento contra a miotoxicidade induzida pela BthTX-I, reforçando o potencial do inibidor rBaltMIP para ser utilizado em complemento à soroterapia antiofídica, umas vez que não se é esperado a produção de anticorpos quando utilizado no tratamento **(Fig.22)**. A produção de anticorpos só foi eficiente quando os camundongos foram

submetidos a imunizações sucessivas, com via de administração diferente e na presença de adjuvante **(Fig.19)**.

Como um dos maiores objetivos dos estudos com inibidores plasmáticos de serpentes é a possível complementação da soroterapia usualmente aplicada em envenenamentos, o soro antiofídico polivalente de uso veterinário da marca Rasg & Aplik (lema bioLOGIC do Brasil Ltda) foi testado para a avaliação das propriedades inibitórias frente à miotoxina Lys49 PLA_2-símile BthTX-I.

Assim sendo, foi determinada a atividade miotóxica de duas formas distintas, a primeira com medição dos níveis de creatina cinase (CK) nos soros dos camundongos **(Fig.22)** e a segunda por meio da análise histopatológica das fibras musculares dos músculos gastrocnêmios dos camundongos **(Fig.25)**. Os animais utilizados nesses testes receberam injeção i.m. no músculo gastrocnêmio contendo: 50 µL de PBS sozinho (G9); 50 µg da miotoxina BthTX-I (G1); 50 µg de BthTX-I previamente incubada com rBaltMIP (G2); 50 µg de BthTX-I previamente incubada com soro antiofídico (G3); 50 µg de BthTX-I previamente incubada com soro antiofídico complementado com rBaltMIP (SA + rBaltMIP) (G4) **(Tabela 2A)**. A miotoxina utilizada nesses experimentos foi a Lys49 PLA_2-símile BthTX-I. Esta toxina foi escolhida neste experimento, pois os testes anteriormente realizados mostraram que o inibidor rBaltMIP, assim como os resultados obtidos por Santos-filho (2011) com relação ao αBaltMIP nativo, possui maior especificidade por PLA_2s-símiles Lys49.

O mesmo experimento foi feito para avaliar a neutralização das ações miotóxicas da peçonha bruta (PB) de *B. jararacussu* **(Tabela 2B)***. Os* animais utilizados nesses testes receberam injeção i.m. no músculo gastrocnêmio contendo: 50 µL de PBS sozinho (G9); 50 µg da PB (G5); 50 µg da PB previamente incubada com rBaltMIP (G6); 50 µg da PB previamente incubada com SA (G7); 50 µg da PB previamente incubada com SA complementado com rBaltMIP (SA + rBaltMIP) (G8).

A injeção do soro antiofídico e a quantidade aplicada no animal foram seguidas de acordo com as determinações do fabricante, como descrita no item 3.1.3. Nestas atividades, foram testadas a capacidade do rBaltMIP de inibir a miotoxicidade causada pela BthTX-I e pela peçonha bruta de *Bothrops jararacussu*, além disso, foi avaliado também o potencial do soro antiofídico de uso veterinário inibir a miotoxicidade causada e a possível complementação do inibidor recombinante rBaltMIP na soroterapia atualemente utilizada.

A concentração do rBaltMIP utilizada na incubação prévia por 30 min. do inibidor com a miotoxina, na incubação com o soro antiofídico e miotoxina juntos, na incubação com a peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e na incubação da peçonha bruta, rBaltMIP e soro antiofídico, foi na proporção 1:1 em razão molar (miotoxina/inibidor). Na atividade miotóxica realizada por meio da medição dos níveis de creatina cinase no plasma dos camundongos, pode-se observar que o soro antiofídico comercial de uso veterinário foi capaz de neutralizar parte da atividade miotóxica da peçonha bruta (PB) de *Bothrops jararacussu* (~40%) e de BthTX-I (~30%), tendo maior eficiência na inibição da PB (~40%). Ademais, o inibidor rBaltMIP foi capaz de neutralizar com maior eficiência a miotoxicidade causada tanto pela toxina quanto pela PB, de maneira estatisticamente significante e superior ao soro antiofídico ($p<0,05$) **(Fig.23),** contudo o rBaltMIP mostrou-se mais efetivo na inibição da mionecrose causada pela toxina BthTX-I – aproximadamente 60% enquanto a inibição da PB foi de cerca de 50%. Além disso, quando o antisoro comercial foi complementado com rBaltMIP (SA + rBaltMIP) (G4), foi possível observar um efeito sinérgico da sua atividade mostrando maiores neutralizações da miotoxicidade tanto da PB quanto da BthTX-I (cerca de 55% para ambas), quando comparada com a utilização apenas do SA. A diferença estatisticamente significante entre a inibição da atividade miotóxica do rBaltMIP e Soro+rBaltMIP frente á inibição do soro antiofídico (SA), evidencia uma possível aplicação para esse inibidor. O soro antiofídico veterinário (SA) e rBaltMIP também foram testados para descartar qualquer possibilidade de causarem miotoxicidade nos animais e sendo estes não causadores de miotoxicidade, cujos níveis de CK encontrados foram próximos aos níveis encontrados quando foi utilizado o controle negativo (PBS).

Mais uma vez, com o objetivo de avaliar o potencial do rBaltMIP em complementar a soroterapia convencionalmente utilizada, avaliamos as atividades miotóxicas da BthTX-I e da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* onde foram injetados os agentes miotóxicos (proteína e peçonha) e após 30 minutos foram inoculados os agentes neutralizantes: soro antiofídico (SA), rBaltMIP e SA+ rBaltMIP. Nesta atividade, foi observado que, após 30 minutos da injeção da BthTX-I, o rBaltMIP diminuiu a atividade miotóxica dessa proteína em aproximadamente 50%, assim como o soro antiofídico. Contudo, a solução complementada de anti-soro não foi estatisticamente maior que a atividade do próprio inibidor ou do próprio anti-soro. O mesmo pode ser observado na inibição da mionecrose causada pela peçonha bruta (PB) de *Bothrops jararacussu*. Esse dado demonstra a importância no

tempo de administração do agente inibidor da ação tóxica, mesmo com a utilização do SA complementado com rBaltMIP **(Fig.24)**.

Após experimento de miotoxicidade conforme descrito no item 3.2.10.1., foi feita a análise histopatológica das fibras musculares de camundongos demonstrando que tanto a BthTX-I, quanto a peçonha bruta de *B. jararacussu* são capazes de induzir dano às fibras musculares dos animais, recrutando infiltrados leucocitários, formando intenso acúmulo de líquido intercelular **(Fig.25A e B)** além de, no caso da peçonha bruta, induzir uma intensa hemorragia, ilustrada pela presença de grande quantidade de hemácias no músculo **(Fig.25B).** Outra observação que pode ser feita é que a BthTX-I sofre uma diminuição da sua capacidade de dano local **(Fig.25C)**, observada pela manutenção da integridade das fibras musculares e principalmente pela diminuição do número de infiltrados leucocitários. Ademais, de acordo com a **figura 25E**, pode-se observar também, que o soro antiofídico comercial inibe parcialmente a atividade miotóxica da BthTX-I, contudo, com menor intensidade que o alfa inibidor recombinante rBaltMIP.

Para tentar validar a hipótese de que o rBaltMIP pode complementar a soroterapia convencional, o rBaltMIP foi adicionado ao soro antiofídico comercial na proporção molar 1:1 (rBaltMIP:BthTX-I) e incubado a 37^0C. A análise histopatológica das fibras musculares que foram inoculadas com BthTX-I, previamente incubada por 30 minutos com a solução contendo soro antiofídico complementado com rBaltMIP **(Fig.25C)** mostrou que essa complementação da soroterapia convencional pode ser viável, uma vez que a solução de antisoro complementada foi capaz de reduzir os danos musculares comparados a BthTX-I e principalmente a BthTX-I previamente incubada somente com o soro antiofídico.

Para reforçar ainda mais a idéia da complementação da soroterapia, foi injetada peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* sozinha ou previamente incubada com rBaltMIP, soro antiofídico e soro antiofídico complementado com rBaltMIP, no músculo gastrocnêmico de camundongos. A análise em microscopia óptica das lâminas histológicas do gastrocnêmico de camundongos mostra que, quando a peçonha bruta foi injetada nos músculos dos animais **(Fig.25B)**, pode-se observar hemorragia abundante, além de grande dano às fibras musculares e intenso infiltrado leucocitário.

Quando a peçonha bruta de *B. jararacussu* foi previamente incubada com rBaltMIP **(Fig.25D),** a preservação das fibras musculares e a diminuição de infiltrados pode ser observada, contudo, ainda pode-se visualizar a presença de

hemácias, caracterizando que rBaltMIP não é capaz de inibir a hemorragia. Contudo, com a prévia incubação do soro antiofídico com a peçonha bruta **(Fig.25F)**, a hemorragia não pode ser visualizada, entretanto a preservação das fibras musculares não é tão evidente quanto a incubação prévia com rBaltMIP.

Para mais uma vez testarmos a hipótese da complementação da soroterapia convencional com rBaltMIP, o inibidor expresso foi adicionado ao soro antiofídico comercial. A análise histopatológica das fibras musculares que foram inoculadas com a peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* previamente incubada por 30 minutos com a solução contendo soro antiofídico complementado com rBaltMIP **(Fig. 25D),** mostrou mais uma vez a grande aplicação que essa complementação da soroterapia convencional pode ter, uma vez que a solução de antisoro complementada foi capaz de reduzir os danos musculares comparados a peçonha bruta sozinha ou previamente incubada somente com o soro antiofídico, além de mostrar uma melhora também na hemorragia.

Enfim, em busca de estudar o potencial do rBaltMIP complementar a soroterapia convencionalmente utilizada, foi avaliada a atividade miotóxica da BthTX-I e da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu*, além de suas inibições com soro antiofídico e rBaltMIP 30 minutos após a inoculação dos agentes miotóxicos (proteína e peçonha) **(Fig.24).**

Nesta atividade, pode-se observar que, quando injetado 30 minutos após a BthTX-I, o rBaltMIP diminuiu drasticamente a atividade miotóxica dessa proteína, assim como o soro antiofídico, contudo, a solução complementada de antissoro não foi estatisticamente maior que a atividade do próprio inibidor ou do próprio antissoro **(Fig.24)**. O mesmo pode ser visualizado para a peçonha bruta de *Bothrops jararacussu*. Esse dado demonstra que, mesmo utilizando um soro antiofídico complementado, o tempo de administração deste é de fundamental importância para sua eficiência.

Devido a todos os fatores apontados anteriormente com relação aos efeitos tóxicos de componentes presentes nas peçonhas de serpentes, como gravidade do envenenamento causado principalmente pelas miotoxinas, a baixa imunogenicidade dessas moléculas e inespecificidade do soro antiofídico, entre outros, o estudo do rBaltMIP como inibidor recombinante de PLA_2s do grupo II de serpentes torna-se importante devido às possíveis aplicações clínicas, podendo ser útil na indústria biotecnológica, em estudos de mecanismo de ação de peçonhas, designers de inibidores sintéticos e compreensão de outras características funcionais e estruturais

das miotoxinas. Ainda, esses PLIs possuem grande potencial para complementar a soroterapia antiofídica atualmente utilizada uma vez que, são específicos para algumas PLA_{2s} tóxicas podendo assim, neutralizar melhor seus efeitos.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

- As toxinas BthTX-I e BthTX-II da peçonha *de Bothrops jararacussu*, bem como o inibidor recombinante rBaltMIP, objetos de estudo do presente trabalho, foram obtidos na sua forma ativa e em elevado grau de pureza.

- A caracterização bioquímica do rBaltMIP demonstrou que o rBaltMIP possui em solução uma Mr 77 kDa, é uma proteína ácida (pI 5,8) e com conteúdo de carboidrato de 10%. Apresentou ainda, massa molecular relativa avaliada através da eletroforese em SDS-PAGE de 21 kDa e por Maldi TOF/TOF de 19.572,99 m/z. O sequenciamento dos peptídeos trípticos e alinhamento demonstraram que este apresenta 100% de homologia em relação ao inibidor nativo (Santos-Filho et al. 2014) e de 92 a 96% com inibidores isolados do soro de outras peçonhas bothrópicas;

- A caracterização funcional do rBaltMIP mostrou ter este inibidor efetividade estatisticamente significantes na inibição da atividade edematogênica das toxinas BthTX-I e BthTX-II nas razões molares (mol/mol) 1:2 e 1:7, calculadas através de suas CE50s. Da mesma forma este inibidor mostrou-se efetivo na inibição da atividade miotóxica destas mesmas toxinas quando nas razões molares (mol/mol) 1:1 e 1:2 mostrando diferenças estatísticas significativas;

- Quanto à utilização do inibidor como complemento à soroterapia, concluímos ser o rBaltMIP um potencial agente complementar ao soro antiofídico atualmente utilizado mostrando-se altamente específico e ligando-se apenas à toxina BthTX-I. Apresentou-se imunogênico apenas quando administrado em doses repetidas em intervalos de 15 e 30 dias, no entanto, não foi observada a produção de anticorpos anti-rBaltMIP no soro dos animais em experimentos de inibição de miotoxicidade, neutralizando a ação miotóxica da toxina sem, no entanto, ser imunogênica. Reforçando o potencial em complementar a soroterapia antiofídica, os experimentos de neutralização da miotoxicidade feitos com a miotoxina Lys49 PLA_2-símile BthTX-I mostraram que o rBaltMIP foi mais eficiente em inibir seus efeitos miotóxicos que o próprio soro antiofídico quando usado isoladamente ou mesmo quando o soro foi utilizado juntamente com o rBaltMIP. Ademais, a análise histopatológica das fibras

musculares em que foram inoculadas soluções com peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e BthTX-I previamente incubado por 30 minutos com a solução contendo soro antiofídico complementado com rBaltMIP, mostrou mais uma vez a grande aplicação que essa complementação da soroterapia convencional poderá ter, uma vez que, a solução de antisoro complementada foi capaz de reduzir os danos musculares comparados a peçonha bruta sozinha ou previamente incubada somente com o soro antiofídico, além de mostrar uma melhora também na hemorragiaa.

Portanto, fica evidenciado o potencial terapêutico do inibidor rBaltMIP.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

AMARAL, A. Contribuição à Biologia dos Ophideos Brasileiros (habitat, hábitos e alimentação); 1a Nota Prévia. (Em coletânea dos trabalhos do Instituto Butantan de 1918 a 1924), São Paulo, p.175-181, 1927.

AMARAL, C. F. S.; SILVA, O.A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following Bothrops jararaca and B. jararacussu snake bite. *Toxicon*., v.23, n.6, p.877-885, 1985.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SAMPAIO, S.V.; CUNHA, O.A.B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of a new clotting factor from Bothrops jararacussu (jararacuçu) venom. *Toxicon*., v.35, n.7, p.1043-1052, 1997.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ÂNGULO, Y.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Myotoxic phospholipases A_2 in Bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie.*, v.82, p.755-63, 2000.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; FULY, A.R.; CORRÊA, F.M.A.; ROSA, J.C.; GREENE, L.J.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 from Bothrops jararacussu snake venom. *Biochemical pharmacology*., v. 64, n. 4, p. 723-732, 2002.

ARAÚJO, F.A.A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R.F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: Cardoso JLC, França OSF, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V (orgs). Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, p.6-12, 2003.

ARNI, R.K.; WARD, R.J.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R. Crystallization and preliminary diffraction data of bothropstoxin I isolated from the venom of *Bothrops jararacussu. Toxicon*, v.33, p.383-386, 1995.

ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A_2 - A structural review. *Toxicon.*, v.34, p.827-841, 1996.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; COIMBRA, T.M.; HERING, S.E.; ROSSI, M.A.; LAURE, C.J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (Crotalus durissus terrificus) envenomation in Brazil. *Toxicon*., v. 23, n. 4, p. 631-636, 1985.

BERNARDE, P.S. MUDANÇAS NA CLASSIFICAÇÃO DE SERPENTES PEÇONHENTAS BRASILEIRAS E SUAS IMPLICAÇÕES NA LITERATURA MÉDICA. *Gazeta Médica da Bahia*., v.81, p.55-63, 2011.

BIRNBOIM, H. C.; SEDEROFF, R. R.; PATERSON, M. C. Distribution of polypyrimidine· polypurine segments in DNA from diverse organisms. *European Journal of Biochemistry*., v. 98, n. 1, p. 301-307, 1979.

BIMBOIM, H. C.; DOLY, Jo. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*., v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. *Cad Saúde Pública.,* v.19, p.7-16, 2003.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C.J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de indormação. *Cad Saúde Pública.,* v.18, p.735-746, 2002.

BOFF, G. J. Envenenamento por picada de serpente - gênero *Bothrops*: revisão. *Revista Veterinária em Foco*, v. 2, n. 2, p.121-135, 2005.

BOLDRINI-FRANÇA, J., CORREA-NETTO, C., SILVA, M.M.S., RODRIGUES, R.S., DE LA TORRE, P., PEREZ, A., SOARES, A.M., ZINGALI, R.B., NOGUEIRA, R.A., RODRIGUES, V.M., SANZ, L. & CALVETE, J.J. Snake venomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subpecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite managemente. *Jornal os Proteomics,* 73, 1758-1776. 2010.

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LISANO, S.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. & HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Effects of aqueous extract of Casearia sylvestris (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A(2). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology.,* v.127, p.21-30, 2000.

BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; OVADIA, M. In vitro activity of BaH1, the main hemorrhagic toxin of Bothrops asper snake venom on bovine endothelial cells. *Toxicon*., v. 33, n. 10, p. 1387-1391, 1995.

BORTOLETO, R.K.; WARN, R.J.; GIGLIO, J.R; CINTRA, A.C.; ARNI, R.K. Crystallization of bothropstoxin II isolated from the venom of Bothrops jararacussu. *Toxicon*, v.34, p.614-617, 1996.

BORTOLETO, R. K.; MURAKAMI, M.T.; WATANABE, L.; SOARES, A.M.; ARNI, R.K. Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of Bothrops jararacussu. *Toxicon*, v. 40, p. 1307-1312, 2002.

BRAHMA, R.K.; McCLEARY, R.J.R.; KINI, R.M.; DOLEY, R. Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. *Toxicon*, v.93, p.1-10, 2015.

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

BRASIL. MINISTÉRIO da SAÚDE/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net – site: http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/ data de acesso: 09/03/15.

BRASIL. MINISTÉRIO da SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. 2001.

BRAUD, Sandrine; BON, Cassian; WISNER, Anne. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*, v.82, p.851-859, 2000.

CALGAROTTO, A.K.; DAMICO, D.C.S.; PONCE-SOTO, L.A.; BALDASSO, P.A.;SILVA, S.L.; SOUZA, G.H.M.F.; EBERLIN, M.N.; MARANGONI, S. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A 2 BmTX-I isolated from Bothrops moojeni snake venom. *Toxicon*., v. 51, n. 8, p. 1509-1519, 2008.

CALVETE, J.J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.;ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon*., v. 45, n. 8, p. 1063-1074, 2005.

CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS letters*., v. 583, p. 1736-1743, 2009.

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

CASTRO, I. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase a toxicidade renal. *O Mundo Da Saúde.,* v. 30, p. 644-653, 2006.

CEREGHINO, J.L.; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris. Microb. reviews*., v. 24, p.45-66, 2000.

CENTRO DE ESTUDOS DE VENENOS E ANIMAIS PEÇONHENTOS da UNESP – CEVAP. – site: http://www.cevap.org.br/ data de acesso: 10/05/15.

CINTRA, A.C.O., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., GIGLIO, J. R. Bothropstoxin-I: Amino Acid Sequence and Function. *Journal of Protein Chem.,* v.12, p.57-64,1993.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; PIZZO, P.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PONCE-SOTO, L.A.; ROSSETTO, O.; LOMONTEM B.; GUTIÉRREZ, J.M.; POZZAN T.;

MONTECUCCO, C. Calcium imaging of muscle cells treated with snake myotoxins reveals toxin synergism and presence of acceptors. *Cellular and molecular life sciences.,* v.66, n.10, p.1718-1728, 2009.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; CACCIN, P.; CHIAVEGATO, A.; PIZZO, P.; CARMIGNOTO, G.; ÂNGELO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J.M.; MONTECUCCO, C. *Bothrops snake* myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* v.107, p.14140–14145, 2010.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; PIZZO, P.; ÂNGELO, Y.; GUTIERREZ, J.M.; MONTECUCCO, C.; LOMONTE, B. The C-terminal region of a Lys49 myotoxin mediates Ca 2+ influx in C2C12 myotubes. *Toxicon*, v.55, n.2, p.590-596, 2010.

CLARK, W.C.; VORIS, H.K. Venom Neutralization by Rattlesnake Serum Albumin. *Science*., v.164, p.1402-1404, 1969.

CORRÊA, L. C.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; CINTRA, A.C.O.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Preliminary X-ray crystallographic studies of BthTX-II, a myotoxic Asp49-phospholipase A2 with low catalytic activity from Bothrops jararacussu venom. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications.*, v.62, n.8, p.765-767, 2006.

CORRÊA, L. C.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; CINTRA, A.C.O.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A 2 with low catalytic activity: insights into Ca 2+-independent catalytic mechanism*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics.,* v.1784, n.4, p.591-599, 2008.

CORREA-NETTO, C. Estudo imunoquímico do veneno de *Bothrops jararacussu,* Lacerda 1884 e identificação de moléculas biomarcadoras como ferramenta para o desenvolvimento de diagnóstico. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2007. 91f.

CORREA-NETTO, C.; TEIXEIRA-ARAUJO, R.; AGUIAR, A.S.; MELGAREJO, A.R.; DE-SIMONE, S.G.; SOARES, M.R.; FOGEL, D.; ZINGALI, R.B. Immunome and venome of Bothrops jararacussu: a proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. *Toxicon*., v. 55, p. 1222-1235, 2010.

COSTA, E. P.; CLISSA, P.B.; TEIXEIRA, C.F.P.; MOURA-DA-SILVA, A.M. Importance of Metalloproteinases and Macrophages in Viper Snake Envenomation–Induced Local Inflammation. *Inflammation.*, v. 26, n. 1, p. 13-17, 2002.

COSTA, H.C. & BÉRNILS, R.S. Devemos aplicar, na literatura médica, as mudanças recentes na classificação das serpentes? *Gazeta Médica da Bahia*., v.81, p.28-32, 2012.

COSTA, T. R.; MENALDO, D.L.; OLIVEIRA, C.Z.; SANTOS-FILHO, N.A.; TEIXEIRA, S.S.NOMIZO, A.; FULY, A.L.; MONTEIRO, M.C.; SOUZA, B.M.; PALMA, M.S.; STABÉLI, R.G.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.S. Myotoxic phospholipases A 2

isolated from Bothrops brazili snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. *Peptides*., v. 29, n. 10, p. 1645-1656, 2008.

CRUZ, L. S.; VARGAS, R. & LOPES, A.A. Snakebite envenomation and death in the developing world. *Ethnicity & Disease.,* v.19, p.42-46, 2009.

CREGG, J.M.; TOLSTORUKOV, I.; KUSARI, A.; SUNGA, J.; MADDEN, K.; CHAPPEL. Expression in the yeast Pichia pastoris. *Methods in enzymology*., v. 463, p. 169-189, 2009.

DALY, R. & HEARN, M.T.W. Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production*. J. Mol. Recognit*., v.18, p.119-138, 2005.

DA SILVA, M.T.; GARRAT, R.C.; MASCARENHAS, Y.P.; GIGLIO, J.R.; CINTRA, A.C.; AZEVEDO, W.F.ARNI, R.K.; WARD, R.J. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes inbothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A2 homologue*. Proteins.,* v.30, p.442-454, 1998.

DA SILVA, N.M.V.; ARRUDA, E.Z.; MURAKAMI, Y.L.B.; MORAES, R.A.M.; EL-KIK, C.Z.; TOMAZ, M.A.; FERNANDES, F.F.A.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R. & MELO, P.A. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by Bothrops snake venoms in a mouse model. *Toxicon.*, v.50, p.196-205, 2007.

DE PAULA, R.C.M.F. Perfil epidemiológico dos casos de acidentes ofídicos atendidos no hospital de doenças tropicais de Araguaína –TO (Triênio 2007-2009). São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN); autarquia associada à Universidade de São Paulo, 2010. 104f

DEEPA, M.; GOWDA, T.V. Purification and characterization of a glycoprotein inhibitor of toxic phospholipase from *Withania somnífera. Arch. Biochem. Biophys.,* v.408, p.42-50, 2002.

DENNIS, E.A., CAO, J., HSU, Y.H., MAGRIOTI, V., KOKOTOS, G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem,. v.*111, p.6130–6185, 2011.

DEY, A. & DE, J.N. Phytopharmacology of antiophidian botanicals: A review. *International Journal of Pharmacology*., v.8, p.62-79, 2012.

DIJKSTRA, B. W.; DRENTH, J.; KALK, K. H. Active site and catalytic mechanism of phospholipase A2. 1981 a.

DIJKSTRA, B.W.; KALK, K.H.; HOL, W.G.; DRENTH, J. Structure of bovine pancreatic phospholipase A2 at 1.7 Å resolution. Journal of molecular biology, v. 147, n. 1, p. 97-123, 1981 b.

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

DOS SANTOS, M.C.; GONÇALVES, L.R.C.; FORTES-DIAS, C.L.; CURY, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; FURTADO, M.F.D. A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.,* v.34, n.2, p.77-83, 1992.

DUNN, R.D.; BROADY, K.W. Snake inhibitors of phospholipase A_2 enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1533, p. 29-37, 2001.

ESTEVÃO-COSTA, M.I.; ROCHA, B.C.; MUDADO, M.A.; REDONDO, R.; FRANCO, G.R.; FORTES-DIAS, C.L. Prospection structural analysis and phylogenetic relationships of endogenous gamma-phospholipase A_2 inhibitors in Brazilian *Bothrops* snakes (Viperidae, Crotalinae). *Toxicon.*, v.58, p.122-9, 2008.

FAURE, G. Natural inhibitors of toxic phospholipases A_2. *Biochem.*, v.82, p.833-840, 2000.

FERNANDES, C.A.H.; BORGES, R.J.; LOMONTE, B.; FONTES, M.R.M. A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A2-like proteins from viperid snake venoms. *Biochim Biophys Acta.*, v.1844, p.2265-2276, 2014.

FERREIRA, S.H. A BRADYKININ-POTENTIATING FACTOR (BPF) PRESENT IN THE VENOM OF *BOTHROPS JARARACA. Brit. J. Pharmacol*., v.24, v.163-169, 1965 a.

FERREIRA, S.H.; SILVA, M.R. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia*., v.15, p.347-349.1965 b.

FERWICK, A.M.; GUTBERLET Jr, R.L.; PARKINSON, C.L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zool J Linn Soc.,* v.156, p.617-640, 2009.

FLEER, E. A.M.; VERHEIJ, H.M.; HAAS, G.H. The primary structure of bovine pancreatic phospholipase A2*. European Journal of Biochemistry*., v. 82, n. 1, p. 261-269, 1978.

FORTES-DIAS, C.L. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipase A_2 in the blood plasma of snakes. *Toxicon.*, v.40, p.481-484, 2002.

FRANCIS, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; KAISER, I. Myotoxin II from *Bothrops asper (Terciopelo*) venom is a lysine-49 phospholipase A 2. *Archives of biochemistry and biophysics*., v. 284, n. 2, p. 352-359, 1991.

FULY, A.L.; CALIL-ELIAS, S.;. MARTINEZ, A.M.B.; MELO, P.A.; GUIMARÃES, J.A. Myotoxicity induced by an acidic Asp-49 phospholipase A 2 isolated from Lachesis muta snake venom: comparison with lysophosphatidylcholine. *The international journal of biochemistry & cell biology*., v. 35, n. 10, p. 1470-1481, 2003.

GEOGHEGAN, P.; ANGULO, Y.; CANGELOSI, A.; DIAZ, M.; LOMONTE, B. Characterization of a basic phospholipase A 2-homologue myotoxin isolated from the venom of the snake Bothrops neuwiedii (yarara chica) from Argentina. *Toxicon*., v. 37, n. 12, p. 1735-1746, 1999.

GHAZARYAN, N.A.; GHULIKYAN, L.; KISHMIRYAN, A.; ANDREEVA, T.V.; UTKIN, Y.N.; TSETLIN, V.I.; LOMONTE ,B.; AYVAZYAN, N.M. Phospholipases A2 from *Viperidae* snakes: Differences inmembranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms. *Biochim Biophys Acta.*, v.1848, p.463-468, 2015.

GIOTTO, M. T.S.; GARATT, R.C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y.P.; GIGLIO, J.R.; CINTRA, A.C.O.; AZEVEDO, W.F.; ARNI, R.K.; WARN. R.J. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: Conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A2 homologue. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.,* v. 30, n.4, p.442-454, 1998.

GIMENES, S.N.; FERREIRA, F.B.; SILVEIRA, A.C.; RODRIGUES, R.S.; YONEYAMA, K.A.; SANTOS, J.I.; FONTES, M.R.; BRITES, V.L.C; SANTOS, A.L.; BORGES, M.H.; LOPES, D.S.; RODRIGUES, V.M. Isolation and biochemical characterization of a γ-type phospholipase A2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. *Toxicon.,* v.81, p.58–66, 2014.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. 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.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L.; ODELL, G.V. Isolation of a myotoxin from Bothrops asper venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon*., v.22, p.115-128, 1984.

GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENÉ, J.A.; CERDAS, L. Effects ofa myotoxic phospholipase A2 isolated from Bothrops asper venom on skele tal muscle sarcoplasmicreticulum. *Toxicon.,* v.81, p.1244–1248, 1987.

GUTIÉRREZ, J.M.; NUÑES, J.; DÍAS, C.; CINTRA, A.C.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A2 isolated from the venom of the snake Bothrops jararacussu. *Exp. Mol. Pathol.,* v.55, p.217-229, 1991.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. *Toxicon*., v.33, p.1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Rev. Biol. Trop*., v. 50, p.377-394, 2002.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A 2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, v. 42, p. 915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J.M.; THREAKSTON, R.D.G. & WARRELL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *Plos Medicine*., v.3, p. 727-731, 2006.

GUTIÉRREZ, J.M. Improving antivenom availability and accessibility: science, technology, and beyond. *Toxicon*., v.33, p.676-687, 2012.

HAGE-MELIM, L. I.S.; SAMPAIO, S.; TAFT, C.; SILVA, C. Phospholipase A2 Inhibitors Isolated From Medicinal Plants: Alternative Treatment Against Snakebites. *Mini-Reviews in Medical Chemistry.*, v.13, p.1348-1356, 2013.

HANSSON, E.; SASA, M.; MATTISSON, K.; ROBLES, A.; GUTIÉRREZ, J.M. Using geographical information systems to identify populations in need of improved accessibility to antivenom treatment for snakebite envenoming in Costa Rica*. PLoS Negl Trop Dis.*, v. 7, n. 1, p. 2009, 2013.

HARRIS, J.B.; SCOTT-DAVEY, T. Secreted Phospholipases A2 of Snake Venoms: Effects on the Peripheral Neuromuscular System with Comments on the Role of Phospholipases A2 in Disorders of the CNS and Their Uses in Industry. *Toxins.,* v.5, p.2533-2571, 2013.

HARTMANN, P.A.; HARTMANN, M.T.; GIASSON, L.O.M. Uso do hábitat e alimentação em juvenis de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae) na Mata Atlântica do sudeste do Brasil. *Phyllomed. Usa.,* v.2, p.35-41, 2003.

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

HIRABAYASHI, T.; MURAYAMA, T.; SHIMIZU, T. Regulatory Mechanism and Physiological Role of Cytosolic Phospholipase A2. *Biol. Pharm. Bull.,* V.27, P.1168-1173, 2004.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, JR. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon*, v.26, p.615-27, 1988.

INOUE, S.; KOGAKI, H.; IKEDA, K.; SAMEJIMA, Y.; OMORI-SATOH, T. Amino acid sequences of the two subunits of a phospholipase A_2 inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. Sequence homologies with pulmonary surfactant apoprotein and animal lectins. *J. Biol. Chem.*, v.266, p.1001–1007, 1991.

INOUE, S.; SHIMADA, A.; OHKURA, N.; IKEDA, K.; SAMEJIMA, Y.; OMORI-SATOH, T.; HAYASHI, K. Specificity of two types of phospholipase A_2 inhibitors from plasma of venomous snakes. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, v.41, p.529-537, 1997.

ITZHAKI, R.F.; GILL, D.M. A microbiuret method for estimating proteins. *Analytical Biochemistry*., v.9, p.401-410, 1964.

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Dose de soro (antiveneno) no tratamento do envenenamento por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrop. Rev. Ass. Med. Brasil*., v.43 , p.74-76, 1997.

JÚNIOR, R. M.; JORGE, M.T.; CAMPOS, F.P.F.; MARTINS, F.P.; BOUSSO, A.; CARDOSO, J.L.C.; RIBEIRO, L.A.; FAN, H.W.; FRANÇA, F.O.L.; SANO-MARTINS, I.S.; CARDOSO, D. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil., *QJM*, v. 90, n. 5, p. 323-334, 1997.

KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R.D.G.; DESMOND, H.; HUTTON, R.A. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from Bothrops jararaca venom. *Toxicon*., v. 29, n. 9, p. 1097-1105, 1991.

KASHIMA, S.; ROBERTO, P.G.; SOARES, A.M.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J.O.; GIULIATI, S.; FARIA Jr., M.; XAVIER, M.A.S.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R.; FRANÇA, S.C. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects1: I—gene expression profile of highly expressed phospholipases A2. *Biochimie.,* v.86, p.211-219, 2004.

KASTURURATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLO, D. G.; SILVA, H. J. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med.,* v.5, p.1591-1604, 2008.

KIHARA, H. Studies on Phospholipase A in *Trimeresurus flavoviridis* Venom. III. Purification and Some Properties of Phospholipase A Inhibitor in Habu Serum. Biochem., v.80, p.341-349, 1976.

KINI, R.M. Venom Phospholipase A_2 Enzymes: Structure; Function and Mechanism. *Toxicon*., v.42, p.827-840, 2003.

KINKAWA, K.; SHIRAI, R.; ATANABE, S.; TORIBA, M.; HAYASHI, K.; IKEDA, K.; INOUE, S. Up-regulation of the expressions of phospholipase A_2 inhibitors in the liver of a venomous snake by its own venom phospholipase A_2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*., v.395, p.377-381, 2010.

KOGAKI, H.; INOUE, S.; IKEDA, K.; SAMEJIMA, Y.; OMORI-SATOH, T.; HAMAGUCHI, K. Isolation and fundamental properties of a phospholipase A_2 inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis. J. Biochem.*, v.106, p.966-971, 1989.

KOH, C.Y.; KINI, R.M. From snake venom toxins to therapeutics – Cardiovascular examples. *Toxicon*., v.59, p.479-506, 2012.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A_2 enzymes. *Prostaglandins e other lipid mediators.*,v.68, p.3-58, 2002.

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

LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipase A_2. *Tips*., v.20, p.162-170, 1999.

LEITE, L.C.C.; FURTADO, M.F.D.; CORREA, T.C.; RAW, I . Characterization of the snake venoms from seven Brazilian species of Bothrops by FPLC anion-exchange chromatography. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry.*, v.102, n.3, p.515-520, 1992.

LIMA, R.M.; ESTEVÃO-COSTA, M.I.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M.; LEE HO, P.; DINIZ, M.R.V.; FORTES-DIAS, C.L. Phospholipase A2 inhibitors (βPLIs) are encoded in the venom glands of Lachesis muta (*Crotalinae, Viperidae*) snakes. *Toxicon.*, v.57, p.172-175, 2011.

LIZANO, S.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; FOX, J.W.; LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M.; GUITIÉRREZ, J.M. Two phospholipase A_2 inhibitors from the plasma of *Cerrophidian* (*Bothrops*) *godmani* which selectively inhibit two different group II phospholipase A_2 myotoxins from its own venom: isolation molecular cloning, and biological properties. *J. Biochem.*, v.346, p.631-639, 2000.

LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A_2 myotoxin inhibitor proteins from snakes mammals and plants. *Toxicon*., v.42, p. 963-977, 2003.

LIZANO, S.; LOMONTE, B.; FOX, J.W.; GUTIÉRREZ, J.M. Biochemical characterization and pharmacological properties of an inhibitor of basic phospholipase A_2 myotoxins from the plasma of the snake of *Bothrops asper. Biochem. J.*, v.326, p.853-859, 1997.

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 mucrosquamatu. Biochimica* et *Biophysjca Acta,* v. 1077 , p.362-370, 1991.

LOMONTE, B.; ANGELO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon.*, v.42, p.885-901, 2003.

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.

LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M. Phospholipases A2 from Viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage? *Acta Chim. Slov.,* v.58, p.647–659, 2011.

LOMONTE, B.; RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A2 to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon.*, v.60, p.520-530, 2012.

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Snake venoms and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 3, p. 1791-1799, 2005.

MARAGANORE, J.M.; MERUTKA, G.; CHO, W.O.N.H.W.A.; WELCHES, W.; KEZDY, F.J.; HEINRIKSON, R.L. A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *Journal of Biological Chemistry*., v. 259, n. 22, p. 13839-13843, 1984.

MARAGANORE, J. M.; HEINRIKSON, R. L. The lysine-49 phospholipase A2 from the venom of Agkistrodon piscivorus piscivorus. Relation of structure and function to other phospholipases A2. *Journal of Biological Chemistry*., v. 268, n. 8, p. 6064-6064, 1993.

MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C.D.; OLIVEIRA, C.Z.; RUEDA A.Q.; MENALDO, D.L.; BELEBONI, R.O.; STABELI R.G.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.M.; SOARES A. M. Snake Venom Phospholipase A_2 Inhibitors: Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v.*7, p.*2328-2339, 2007.

MARCUSSI, S.; BERNARDES, C.P.; SANTOS-FILHO, N.A.; MAZZI, M.V.; OLIVEIRA, C.Z.; IZIDORO, L.F.M.; SOARES, A.M. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from Bothrops jararacussu snake venom with antiplatelet activity. *Peptides.*, v. 28, p. 2328-2339, 2007.

MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon.*, v.36, p.1749-1800, 1998.

MARQUES, O.A.V., ESTEROVIC, A.; SAZIMA, I. Serpentes da Mata Atlântica. Guia ilustrado para a Serra do Mar. Ribeirão Preto; Holos; 2001.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*., v.1477, n.1, p.146-156, 2000.

MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; STÁBELI, R.G.; FRANCO, J.J.; TICLI, F.K.; CINTRA, A.C.O.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V.. A new hemorrhagic metalloprotease from Bothrops jararacussu snake venom: isolation and biochemical characterization. *Toxicon*, v.44, p.215-223, 2004.

MAZZI, M. V.; MAGRO, A.J.; AMUI, S.F.; OLIVEIRA, C.Z.; TICLI, F.K.; STÁBILE, R.G.; FULY, A.L.; ROSA, J.C.; BRAZ, A.S.K.; FONTES, M.R.M.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. Molecular characterization and phylogenetic analysis of BjussuMP-I:

a RGD-P-III class hemorrhagic metalloprotease from Bothrops jararacussu snake venom. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*., v. 26, p. 69-85, 2007.

MEBS, D. Scorpions and snakes, such as cobras, mambas and vipers made the African continent famous for venomous animals. *Bull Soc Pathol Exot.*, v.95, p.131, 2002.

MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso JLC, França OSF, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V (orgs.). Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, p.33-61, 2003.

MELO, P.A.; SUAREZ-KURTZ, G. Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by Bothrops jararacussu venom: antagonism by heparin and by the serum of South American marsupials. *Toxicon*., v.26, n.1, p.87-95, 1988.

MOORJAN, M.; HONORÉ, S.; BAZAA; A.; ABDELKAFI-KOUBAA, Z.; ELLAFI, A.; MABROUK, K.; KOVACIC, H.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N.; LUIS, J. PIVL, a snake venom Kunitz-type serine protease inhibitor, inhibits in vitro and in vivo angiogenesis. *Microvascular Research*., v.95, p.149-156, 2014.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; CARDOSO, D.F.; TANIZAKI, M.M. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different Bothrops species. *Toxicon*., v.28, n.11, p.1293-1301, 1990.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R.D.G. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of Bothrops snakes. *Toxicon*., v.29, n.6, p.713-723, 1991.

MOURA, V.M.; BEZERRA, A.N.S.; MOURÃO, R.H.V.; LAMEIRAS, J.L.V.; RAPOSO, J.D.A.; SOUSA, R.L.; BOECHAT, A.L.; OLIVEIRA, R.B.; CHALKIDIS, H.M.; SANTOS, M.C. A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (*Melastomataceae*) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. *Toxicon*., v.85, p.59-68, 2014.

MOURA, V.M.; SOUSA, L.A.F.; SANTOS, M.C.; RAPOSO, J.D.A.; LIMA, A.E.; OLIVEIRA, R.B.; SILVA, M.N.; MOURÃO, R.H.V. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom*. Journal of Ethnopharmacology.,* v.161, p.224-232, 2015.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Secretory Phospholipase A2. *Biol. Pharm. Bull.,* v.27, p.1158-1164, 2004.

MURAKAMI, M.; TAKETOMI, Y, MIKI, Y.; SATO, H.; HIRABAYASHI, T; YAMAMOTO, K. Recent progress in phospholipase A2 research: From cells to animals to humans. *Progress in Lipid Research*., v.50, p.152-192, 2011.

NISHIOKA, S.A.; SILVEIRA, P.V. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lanceheaded viper bite in a Brazilian teaching hospital. *Am. J. Trop. Med. Hyg.,* v.47, p.805-810, 1992.

NISHIDA, M.; OKAMOTO, M.; OHNO, A.; OKUMURA, K.; HAYASHI, K.; IKEDA, K.; INOUE, S. Inhibitory activities of the heterotrimers formed from two α-type phospholipase A_2 inhibitory proteins with different enzyme affinities and importance of the intersubunit electrostatic interaction in trimer formation, *Biochim. Biophys. Acta*., v.1804, p.2121-2127, 2010.

NOBUHISA, I.; INAMASU, S.; NAKAI, M.; TATSUI, A.; MIMORI, T.; OGAWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; HATTORI, S.; KIHARA, H.; OHNO, M. Characterization and evolution of a gene encoding a *Trimeresurus flavoviridis* serum protein that inhibits basic phospholipase A2 isozymes in the snake's venom. *Eur. J. Biochem*., v.249, p.838-845, 1997.

NÚÑEZ, C. E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A 2 from Agkistrodon piscivorus piscivorus snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities.*Toxicon*., v. 39, n. 10, p. 1587-1594, 2001.

NUÑEZ, V.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; PONCE-SOTO, L. A.; MERFORT, I.; LOMONTE, B. Inhibitory effects of *Piper umellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipase A_2 from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytochem.*, v.66, p.1017-1025, 2005.

OHKURA, N.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A_2 inhibitor from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus. J. Biochem.*, v.113, p.413-419, 1993.

OKUMURA, K.; OHKURA, N.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. A novel phospholipase A2 inhibitor with leucine-rich repeats from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p.19469-19475, 1998.

OKUMURA, K.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Identification of β-type phospholipase A2 inhibitor in a nonvenomous snake, *Elaphe quadrivirgata*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 408, p.124-30, 2002.

OKUMURA, K.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Identification and characterization of a serum protein homologous to alpha-type phospholipase A2 inhibitor (PLIalpha) from a nonvenomous snake*, Elaphe quadrivirgata. IUBMB Life.*, v.55, p.539-545, 2003.

OLIVEIRA, C.Z.; MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; SANT´ANA, C.D.; JANUÁRIO, C.D.; LOURENÇO, M.V.; SAMPAIO, S.V.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M. Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *J. Ethnopharmacol.*, v.98, p.213-216, 2005.

OLIVEIRA, C.Z.; MENALDO, D.L.; MARCUSSI, S.; SANTOS-FILHO, N.A.; SILVEIRA, L.B.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M. An alpha-type phospholipase A_2 inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: structural and functional characterization. *Biochimie.*, v.90, p.1506-14, 2008.

OLIVEIRA, C.Z.; SANTOS-FILHO, N.A.; MENALDO, D.I.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; GIGLIO, J.R.; CALDERON, I.A.; STÁBILE, R.G.; RODRIGUES, F.H.S.; TASIC, I.; DA SILVA, S. I.; SOARES, A.M. Structural and functional characterization of a γ-Type phospholipase A2 inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma. *Current Topics in Medicinal Chemistry.*, v.11, p.2509–2519, 2011.

OLIVO, R.A.; TEIXEIRA, C.F.P.; WALLACE, J.L.; GUTIÉRREZ, J.M.; ZAMUNER, S.R. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of

bothropic venoms. *Toxicon*, v.49, p.670-77, 2007.

OMORI-SATOH, T.; SADAHIRO, S.; OHSAKA, A.; MURATA, R. Purification and characterization of an antihemorrhagic factor in the serum of *Trimeresus flavoviridis*, a *crotalid*. *Biochimica et Biophysica Acta*., v.285, p.414-426, 1972.

OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; MESA, M.B.; DUQUE, E.; RODRIGUEZ, O.; ARANGO, J.L.; GÓMES, F.; TORO, A.; CANO, F.; RODRIGUEZ, L.M.; CARO, E.; MARTINEZ, J.; CORNEJO, W.; GOMEZ, J.M.; URIBE, F.L.; CÁRDENAS, S.; NÚÑES, V.; DÍAZ, A. Complications of Bothrops, Porthidium, and Bothriechis snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*., v. 40, n. 8, p. 1107-1114, 2002.

OVADIA, M.; KOCHVA, E. Neutralization of *Viperidae* and *Elapidae* snake venoms by sera of different animals. *Toxicon*, v.15, p.541-47, 1977.

OVADIA, M.; KOCHVA, E; MOAV, B. The neutralization mechanism of *Vipera* palaestinae neurotoxin by a purified factor from homologous serum. *Biochimica et Biophysica Acta*., v.491, p.370-386, 1977.

OVADIA, M. Purification and characterization of an antihemorrhagic factor from the serum of the snake *Vipera paloestinae*. *Toxicon*, v. 16, p. 661-672, 1978.

OWNBY, C.L.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A_2 proteins. *Toxicon.*, v.37, p.411-445, 1999.

PEREIRA, M.F.; NOVELLO, J.C.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; LANDUCCI, E.T.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from Bothrops jararacussu (Jararacucu) venom with low phospholipase A2 activity. *J. Protein Chem.,* v.17, p.381–386, 1998.

PALACIO, T.Z. Isolamento e caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de metaloprotease presente no soro da serpente *Bothrops alternatus*. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2014. 102f.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. *Rev. Ass. Med. Brasil.,* v.47, p.24-29, 2001.

PONCE-SOTO, L.A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A_2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochim Biophys Acta.*, v.1770, p.585-93, 2007.

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

QUEIROZ, L. S.; SANTO NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by Bothrops jararacussu snake venom. *Toxicon*., v.22, n.3, p.339-346, 1984.

QUEIROZ, G.P.; PESSOA, L.A.; PORTARO, F.C.V.; FURTADO, M.F.D.; TAMBOURGI, D.V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. *Toxicon.*, v.52, p.842-851, 2008.

QUIRÓS, S.; ALAPE-GIRÓN, A.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Isolation, characterization and molecular cloning of AnMIP, a new alpha-type phospholipase A_2 myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Atropoides nummifer* (Viperidae: Crotalinae). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol*., v.146, p.60-68, 2007.

ROCHA, S.L.G.; LOMONTE, B.; NEVES-FERREIRA, A.G.C.; DOMONT, G.B.; GUTIÉRREZ, J.M.; PERALES, J. Functional analysis of DM64 an antimyotoxic protein with immunoglobulin-like structure from *Didelphis marsupialis* serum. *Eur. J. Biochem.,* v.269, p.6052-6062, 2002.

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

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L.F.M.; TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; FULY, A.R.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A 2 from Bothrops pauloensis snake venom. *Toxicon*., v. 50, n. 1, p. 153-165, 2007.

ROSANY, B.; STRUCHINER, C.J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. *Cad. Saúde Pública*., v.18, p.735-746, 2002.

SAAD, E.; BARROS, L.C.; BISCOLA, N.; PIMENTA, D.C.; BARRAVIEIRA, S.R.; BARRAVIEIRA, B.; FERREIRA, R.S. Intraspecific variation of biological activities in venoms from wild and captive Bothrops jararaca. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*., v. 75, n. 16-17, p. 1081-1090, 2012.

SALLATIN, M.; HUET, J.C.; DEMARTEAU, C.; PERNOLLET, J.C. Reassessment of commercially available molecular-weight standards for peptide sodium dodecul sulfate-polyacrylamide gel-eletrophoresis using eletroblotting and microsequencing. *Eletrophoresis*., v.11, p.34-36, 1990.

SAMY, R.P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; STILES, B.G.; GIRISH, K.S.; SWAMY, S.N. Snake venom phospholipases A(2): a novel tool against bacterial diseases. *Curr. Med. Chem.*, v.19, p.6150–6162, 2012.

SÁNCHEZ, E.E.; RODRÍGUES-ACOSTA, A. Inhibitors of snake venoms and development of new therapeutics. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*., v.30, p. 647–678, 2008.

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

SANTOS-FILHO, N.A. Caracterização funcional e estrutural de um Inibidor de fosfolipase A_2 tipo-α da serpente *Bothrops alternatus*: Clonagem, expressão e mapeamento da região responsável pela atividade inibitória. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2011. 178f.

SANTOS-FILHO, N.A.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; SANTOS-SILVA, L.K.; MENALDO, D.L.; HENRIQUE-SILVA, F.; SOUSA, T.S.; CINTRA, A.C.O.; MAMEDE, C.C.N.; OLIVEIRA, F.; ARANTES, E.C.; ANTUNES, L.M.G.; CILLI, E.M.; SAMPAIO, S.V. Heterologous expression and biochemical and functional characterization of a recombinant alpha-type myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake. *Biochimie.*, v.105, p.119-128, 2014.

SANTOS, M.C.; GONÇALVES, L.R.C.; FORTES-DIAS, C.L.; CURY, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; FURTADO, M.F.D. A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. *Rev Inst Med Trop São Paulo., v.*34, p.77-83, 1992.

SAWAYA, R.J.; MARQUES, O.A.V.; MARTINS, M. Composição e história natural das serpentes de Cerrado de Itirapina, São Paulo, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica.*, v. 8, n. 2, p. 127-149, 2008.

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A_2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta.*, v.1761, p.1246-1259, 2006.

SCOPES, R.K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205-nm. Analytical Biochemistry., v.59, p.277-282, 1974.

SEGREST, J.P.; JACKSON, R.L., ANDREWS, E.P.; MAECHESI, V.T. Human erythrocyte membraneglycoprotein – re-evaluation of molecular weight determined

by SDS polyacylamide gel electrophoresis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.,* v.44, p.390-&, 1971.

SHIMADA, A.; OHKURA, N.; HAYASHI, K.; SAMEJIMA, Y.; OMORI-SATOH, T.; INOUE, S.; IKEDA, K. Subunit structure and inhibition specificity of alpha-type phospholipase A_2 inhibitor from *Protobothrops flavoviridis*. *Toxicon*., v.51, p.787-796, 2008.

SHIRAI, R.; TORIBA, M.; HAYASHI, K.; IKEDA, K.; INOUE, S. Identification and characterization of phospholipase A2 inhibitors from the serum of the japanese rat snake, *Elaphe climacophora*. *Toxicon.*, v.53, p.685-92, 2009.

SILVA, A.M.M.; CARDOSO, D.F.; TANIZAKI, M.M. Differences in distribution os myotoxic protein in venom from different *Bothrops* species. *Toxicon.*, v.5283, p.1293-1301, 1990.

SILVA, A.M.M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THREAKSTON, R.D.G. Isolation and comparation of myotoxins isolated from venoms of different species of Bothrops snakes. *Toxicon.*, v.29, p.713-723, 1991.

SILVA, A.M.M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THREAKSTON, R.D.G. Neutralization of myotoxic activity of Bothrops venoms by antisera to purified myotoxins and to crude. *Toxicon.*, v.29, p.1471-1480, 1991.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGESE, N.; CECCARELLI, B. The effects of Bothrops jararacussu venom and its components on frog nerve-muscle preparation. *Neuroscience*., v.10, n.2, p.475-489, 1983.

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

SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; BORGES, M.H.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; CUNHA, O.A.B.; HOMSI-BRANDESBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. Inhibition of porteases, mytoxins and phospholipases A_2 from *Bothrops* venoms by the heteromeric protein complex of *Didelphys albiventris* opossum serum. *Biochem. Mol. Biol. Int.,* v.43, p.1091-1099, 1997.

SOARES, A.M.; ANZALONI-PEDROSA, L.H.; FONTES, M.R.M.; DA SILVA, R.J.; GIGLIO, J.R. Polyacrylamide gel electrophoresis as a tool for the taxonomic identification of snakes from the *Elapidae* and *Viperidae* families. *J. Venom. Anim. Toxins.,* v.4, p.137-142, 1998.

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

SOARES, A.M.; MARCUSSI, S.; STÁBILI, R.G.; FRANÇA, S.C.; GIGLIO, J.R.; WARD, R.J.; ARANTES, E.C. Structural and functional análisis of BmjMIP, a phospholipase A_2 myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. *Biochem. Biophys. Res. Comunn,,* v. 302, p.193-200, 2003.

SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R. Phospholipases A_2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. *Curr Org Chem.*, v.8, p.1677-1690, 2004a.

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

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

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*., v. 1824, n. 1, p. 164-176, 2012.

THWIN, M.M.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: a mini review of the recent developments (1991-1997). *Toxicon*, v. 36, p. 1471-82, 1998.

THWIN, M.M.; SATISH, R.L.; CHAN, S.T.F.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Functional site of endogenous phospholipase A_2 inhibitor from python serum. Phospholipase A_2 binding and anti-inflammatory activity. *Eur. J. Biochem.,* v.269, p.719-727, 2002.

THWIN, M.M.; SAMY, R.P.; SATYANARAYANAJOIS, S.D.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Venom neutralization by purified bioactive molecules: Synthetic peptide derivatives of the endogenous PLA_2 inhibitory protein PIP. *Toxicon*, v.56, p. 1275-1283, 2010.

TICLI, F.K.; HAGE, L.I.S.; CAMBRAIA, R.S.; PEREIRA, P.S.; MAGRO, A.J.; FONTES, M.R.M.; STÁBILE, R.G.; GIGLIO, J.R.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A_2 inhibitor from *Cordia verbenácea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon*, v.46, p.318-27*,* 2005.

TRENTO, E.P.; GARCIA, O.S.; RUCAVADO, A.; FRANÇA, S.C.; BATALINI, C.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M. Inhibitory properties of the anti-bothropic complex from *Didelphis albiventris* serum on toxic and pharmacological actions of metalloproteases and myotoxins from *Bothropos asper* venom. *Biochem. Pharmacol.*, v.62, p.1521-1529, 2001.

TU, A.T.; BAKER, B.; WONGVIBULSIN, S.; WILLIS, T. Biochemical characterization of atroxase and nucleotide sequence encoding the fibrinolytic enzyme. *Toxicon*., p.1295-300, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. H. O. et al. WHO guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. *Geneva: WHO*, v. 134, 2010.

UETZ, Peter. (ed.), *The Reptile Database,* 2014. Disponível em: http://www.reptiledatabase.org. Acessado em: junho 2015.

ULLAH, A. et al. Crystal structure of Jararacussin-I: The highly negatively charged catalytic interface contributes to macromolecular selectivity in snake venom thrombin-like enzymes. *Protein Science.*, v.22, p.128-132, 2013.

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

VESTERBERG, O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 257, p. 11-19, 1972.

VONK, F.J.; JACKSON, K.; DOLEY, R.; MADARAS, F.; MIRTSCHIN, P.J.; VIDAL, N. Snake venom: From fieldwork to the clinic. *Bioessays.,* v.33, p.269-279, 2011.

ZAGANELLI, G.L.; ZAGANELLI; M.G.M.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C.R.; LIMA, M.E. Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacuçu (Bothrops jararacussu). *Toxicon*., v.34, n.7, p.807-819, 1996.

8. ANEXO 1 - Certificado de Aprovação de ética no Uso de Animais – CEUA.

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 13.1.276.53.1), intitulado "Caracterização Bioquímica e funcional de um inibidor recombinante de miotoxinas, do tipo-α da serpente *Bothrops alternatus*", de autoria de **Tiago Sampaio de Sousa** e **Suely Vilela**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 07/10/2013.

Colaboradores: Norival dos Santos Filho

This is to certify that the work (Protocol number 13.1.276.53.1), entitled: "Caracterização Bioquímica e funcional de um inibidor recombinante de miotoxinas, do tipo-α da serpente *Bothrops alternatus*", by **Tiago Sampaio de Sousa and Suely Vilela** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, October, 7 2013.

Ribeirão Preto, 08 de outubro de 2013.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Vanessa Bombonato Garcia

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 3528 - Fax: (16) 3602 3520