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. α BaltMIP

3. rBaltMIP

4. α PLI

5. Inibição de miotoxidade

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 auxílio 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 república, 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_2 s) 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 (α BaltMIP) 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 pl 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 α PLIs depositados em bancos de dados, observando-se 100% de identidade entre o rBaltMIP e o seu inibidor nativo α BaltMIP, 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 μ g/ μ L e de 0,6183 μ g/ μ L, respectivamente, e quando incubadas com o rBaltMIP houve neutralização de até 65% da miotoxidade induzida por estas enzimas. Já nos ensaios de formação de edema de pata, foram obtidas as CE50 de 0,02581 μ g/ μ L e 0,02810 μ g/ μ L, 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 miotoxidade 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 miotoxidade, pelo soro antiofídico usado atualmente, o estudo do rBaltMIP como inibidor de PLA_2 s 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, α PLI, *Bothrops alternatus*, rBaltMIP, inibição de miotoxidade, α BaltMIP, 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 PLA₂-like BthTX-I and Asp49 PLA₂ 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 α BaltMIP 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 α PLIs deposited in databases, observing a 100% identity between rBaltMIP and its native inhibitor α BaltMIP, 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 μ g/ μ L and 0.6183 μ g/ μ L, respectively, and incubation with rBaltMIP indicated neutralization of up to 65% of myotoxicity. In paw edema formation assays, EC₅₀ of 0.02581 μ g/ μ L and 0.02810 μ g/ μ L, 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 PLA₂ inhibitor becomes promising due to its possible clinical applications, neutralizing quickly and with more efficiency and specificity the toxic actions of venoms.

Keywords: Myotoxins, α PLI, *Bothrops alternatus*, rBaltMIP, myotoxin inhibitor, α BaltMIP, 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 PLA₂ 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 α BaltMIP nativo de *B.alternatus*.

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

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 PLA₂-símile BthTX-I e da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* com incubação de 30 minutos.

Figura 24. Neutralização da atividade miotóxica da miotoxina Lys49 PLA₂-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-PLA₂ - fosfolipase A₂ ácida isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*

BthTX-I ou Lys49 BthTX-I ou PLA₂K49 BthTX-I – Botropstoxina I, fosfolipase A₂ básica, isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*

BthTX-II ou PLA₂Asp49 BthTX-II ou PLA₂D49 BthTX-II – Botropstoxina II, fosfolipase A₂ básica, isolada da peçonha da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*

CB – componente básico da crotoxina, fosfolipase A₂ 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 – ditioneitol

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

PLA₂s - fosfolipases A₂

Lys49 PLA₂ homóloga, “PLA₂-like” protein, Lys49 PLA₂-símile, Lys49 miotóxica = PLA₂ sem atividade catalítica

Asp49 PLA₂ - PLA₂ com atividade catalítica (fosfolipásica)

PLIs – Inibidores de fosfolipases A₂

αBaltMIP – inibidor de PLA₂ 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 A₂ básica, isolada da peçonha da serpente *Bothrops pirajai*

PrTX-III - Piratoxina III, fosfolipase A₂ 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 <i>Bothrops jararacussu</i>	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 <i>Bothrops jararacussu</i>	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 tripticos	59
3.2.6.1.1.	Hidrólise tripsínica <i>in situ</i>	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 <i>in silico</i> 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 (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	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 <i>Western Blotting</i>	67
3.2.9.5.	Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP em soros de camundongos em experimento de miotoxicidade.	68
3.2.10.	Ensaio de miotoxicidade da peçonha de <i>B. jararacussu</i> 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.....	109
4.1.	Obtenção das toxinas BthTX-I e BthTX-II da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	Erro! Indicador não definido.
4.1.1.	Cromatografia de exclusão molecular da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	Erro! Indicador não definido.
4.1.2.	Cromatografia de troca catiônica da fração P4 da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	Erro! Indicador não definido.
4.1.3.	Avaliação do grau de pureza das toxinas.....	Erro! Indicador não definido.
4.2.	Indução da expressão e purificação do inibidor recombinante rBaltMIP	Erro! Indicador não definido.
4.2.1.	Avaliação do grau de pureza do rBaltMIP	Erro! Indicador não definido.
4.3.	Caracterização Bioquímica do rBaltMIP	Erro! Indicador não definido.
4.3.1.	Determinação da Massa Molecular	Erro! Indicador não definido.
4.3.1.1.	Por SDS-PAGE.....	Erro! Indicador não definido.
4.3.1.2.	Por MALD/TOF/TOF MS.....	Erro! Indicador não definido.
4.3.2.	Conteúdo de carboidratos do rBaltMIP após Deglicosilação com PNGase F (D-rBaltMIP)	Erro! Indicador não definido.
4.3.2.1.	Determinação da massa molecular relativa do rBaltMIP Deglicosilado (D-rBaltMIP) por SDS-PAGE	Erro! Indicador não definido.
4.3.2.2.	Determinação da massa molecular do rBaltMIP Deglicosilado (D-rBaltMIP) por MALD/TOF/TOF MS	Erro! Indicador não definido.
4.3.3.	Determinação da Massa Molecular do rBaltMIP em solução..	Erro! Indicador não definido.
4.3.4.	Determinação do Ponto isoeletrico do rBaltMIP	Erro! Indicador não definido.

4.4.	Caracterização Estrutural do rBaltMIP	Erro! Indicador não definido.
4.4.1.	Obtenção dos Peptídeos trípticos do rBaltMIP	Erro! Indicador não definido.
4.4.2.	Grau de homologia do inibidor com inibidores descritos na literatura	Erro! Indicador não definido.
4.5.	Caracterização Funcional das toxinas BthTX-I e BthTX-II	Erro! Indicador não definido.
4.5.1.	Atividade Fosfolipásica	Erro! Indicador não definido.
4.5.2.	Atividade miotóxica	Erro! Indicador não definido.
4.5.2.1.	Determinação da CE50 da BthTX-I	Erro! Indicador não definido.
4.5.2.2.	Determinação da CE50 da BthTX-II	Erro! Indicador não definido.
4.5.2.	Atividade edematogênica	Erro! Indicador não definido.
4.5.2.1.	Determinação da CE50 da BthTX-I	Erro! Indicador não definido.
4.5.3.2.	Determinação da CE50 da BthTX-II	Erro! Indicador não definido.
4.6.	Caracterização Funcional do rBatMIP	Erro! Indicador não definido.
4.6.1.	Inibição da atividade miotóxica da BthTX-I e BthTX-II por rBaltMIP ...	Erro! Indicador não definido.
4.6.3.	Inibição da atividade edematogênica das toxinas BthTX-I e II pelo inibidor rBaltMIP.....	Erro! Indicador não definido.
4.7.	Avaliação do potencial imunogênico do rBaltMIP	Erro! Indicador não definido.
4.7.1.	Imunização de animais e obtenção de anticorpos policlonais anti-rBaltMIP em soro.....	Erro! Indicador não definido.
4.7.2.	Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP em soros de camundongos imunizados por ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>).....	Erro! Indicador não definido.
4.7.3.	Avaliação da especificidade do rBaltMIP pela BthTX-I.....	Erro! Indicador não definido.
4.7.4.	Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP, em soros de camundongos imunizados, por <i>Western Blotting</i>	Erro! Indicador não definido.
4.7.5.	Detecção de anticorpos anti-rBaltMIP, em soros de camundongos, em experimento de miotoxicidade.....	Erro! Indicador não definido.
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	Erro! Indicador não definido.
4.8.1.	Neutralização da miotoxicidade da BthTX-I pelo soro antiofídico e rBaltMIP	Erro! Indicador não definido.
4.8.2.	Análise histopatológica da neutralização da miotoxicidade da BthTX-I pelo soro antiofídico e rBaltMIP	Erro! Indicador não definido.
5.	DISCUSSÃO	111
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, caíçaca), *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 *Rhinocerothis*), crotálico (*Crotalus*), 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 *Rhinocerothis* (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 *Rhinocerothis* (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 *Rhinocerothis alternatus*, esta nova nomenclatura taxonômica e sua classificação ainda é pouco utilizada e enfrenta controvérsias entre os profissionais da área médica (COSTA & BERNILS, 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, Homs-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 Homs-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, Homsí-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} apresentou peptídeos 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°C 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 A₂ 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, Homsí-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 A₂ 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 glicoproteína 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 glicoproteína 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 M Tris-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 eluída em 0,05 M de formiato de amônia em pH 3,5 a 5°C com fluxo de 30 mL/h de onde foram obtidas 5 frações (S_I - S_V), das quais a fração S_{II} foi eluída em cromatografia DEAE-cellulose em tampão fosfato de sódio 0,01 M, com fluxo de 15 mL/h, pH 7,4 a 5°C 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 vítimas 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 PLA₂ – símile e da Bothropstoxina-II, uma Asp49 PLA₂ - 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 (PLA₂s), 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 interespecies 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 (MARCUSI, 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 (MAZZI, 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 vítima (CORREA-NETTO, 2007).

1.2.1. Fosfolipases A_2 (PLA₂)

As fosfolipases A_2 (PLA₂s; 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 PLA₂s intracelulares (geralmente associada à membrana e estão envolvidas em funções celulares, como metabolismo de fosfolípidos) e PLA₂ 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 PLA₂s estão envolvidas na hidrólise de fosfolípidos 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 lisofosfolípidos e ácidos graxos, em uma reação dependente de cálcio (ARNI; WARD, 1996; KUDO; MURAKAMI, 2002).

As fosfolipases A₂ constituem uma superfamília de diferentes enzimas pertencentes a pelo menos 15 grupos e seus subgrupos, sendo divididos em seis grandes tipos distintos: PLA₂s secretadas (sPLA₂), dentre estas estão as PLA₂ encontradas em peçonhas de serpentes; PLA₂s citosólicas (cPLA₂); PLA₂s Ca²⁺ independentes (iPLA₂); acetil-hidrolases fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH); as lisossomais (LyPLA₂s) e as mais recentemente descobertas associadas à lipoproteínas (AdPLA₂s). O sistema de classificação agrupa as PLA₂s 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 PLA₂s secretadas (sPLA₂) 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 PLA₂s de peçonhas de serpentes (svPLA₂s) estão classificadas no grupo I (*Elapidae*) e II (*Viperidae*), já as PLA₂s 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 PLA₂s de peçonhas de serpentes, algumas com ações neuronais, outras miotóxicas, outras com ambas as ações e ainda, PLA₂s farmacologicamente inativas. A homologia estrutural das PLA₂s, 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 PLA₂ que perdeu sua capacidade de hidrolisar fosfolípidos após substituição em seu sítio 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 Ca²⁺ e atividade catalítica, sua substituição por Lys49 e mudanças no sítio de ligação do Ca²⁺ interfere na conformação tetraédrica da proteína impedindo sua ligação ao Ca²⁺, 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 PLA₂s-símiles 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 PLA₂, 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 Ca²⁺ no sítio de ligação

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

Após a descoberta da primeira PLA₂ 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 PLA₂ (Bothropstoxina-II, BthTX-II) e outra cataliticamente inativa, Lys49 PLA₂ (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 PLA₂ miotóxicas de peçonhas de oito serpentes *Bothrops spp.* utilizando inicialmente 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 PLA₂, 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 PLA₂ 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 PLA₂s 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 Ca²⁺, 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 PLA₂s e PLA₂ 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 PLA₂s miotóxicas dentro de um único veneno, como frequentemente encontrado na família *Viperidae* (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), prostaciclina e tromboxanos. A síntese desses mediadores ocorre através da cascata do ácido araquidônico, o qual tem seu início com a ação catalítica da fosfolipase A₂ 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 E₂ (PGE₂) 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 PLA₂s das peçonhas teriam importantes papéis na expressão das enzimas COX-1 e COX-2 cujos produtos (como as PGs) mediarão, pelo menos parcialmente, a capacidade das peçonhas de *B. jararaca* e *B. asper* de induzir edema.

Os mecanismos de ações miotóxicas das PLA₂s-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 sarcolema envolvidos nos processos de permeabilização de íons 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 permeabilização do Ca²⁺ extracelular através da membrana plasmática, no entanto, as lesões causadas pelos peptídeos da região C-terminal são independentes da presença do Ca²⁺. 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_2 s 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_2 s-símbles Lys49 miotóxicas (NUÑEZ et al., 2001; SANTOS-FILHO, 2011). Segundo essa hipótese, alguns estudos têm sugerido que PLA_2 s Asp49 miotóxicas possam induzir dano muscular por afetar a integridade das membranas plasmáticas (FULTY 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_2 sAsp49 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_2 Asp49 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* (cumarú), *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 PLA₂ 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 PLA₂s 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 A₂ de venenos de serpentes (svPLA₂), tendo por exemplo, potentes ações anti-inflamatórias (SAMY, 2012). Produtos naturais de organismos marinhos inibidores de PLA₂ são os terpenóides, como os manolídeos e seus derivados, como escalaradial, pseudopterosinas e compostos sintéticos. Manolídeos (MLD) são sesquiterpenóides que possuem pelo menos um grupo reativo aldeído tendo atividade anti-inflamatória por inibir a PLA₂ 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 PLA₂ (SAMY, 2012). Manolídeos isolados de esponja marinha *Luffariella variabilis* mostraram propriedades de inibir PLA₂, 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 A₂, respectivamente. O gambá *Didelphis marsupialis* possui 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 antígeno-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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 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: cardiotoxico, 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 PLA₂ - PLI

As serpentes peçonhentas e não peçonhentas possuem em seu soro proteínas inibidoras de PLA₂s, denominadas de PLI (MARCUSI 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; MARCUSI 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; MARCUSI 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 PLA₂s e miotoxinas (OVADIA et al., 1977; DOMONT et 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 PLA₂s, 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 dermatogênicas 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 γ PLIs (THWIN et al., 2002; THWIN et al., 2010).

Os inibidores do tipo alfa (PLI α s), 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 α PLIs tem-se apresentados eficientes neutralizadores dos efeitos miotóxicos de algumas PLA₂s. Aqueles purificados a partir de plasma de serpentes do gênero *Bothrops*, demonstram certa especificidade por miotoxinas PLA₂s-símile Lys49, as quais possuem grande número de resíduos catiônicos e hidrofóbicos, contudo, o motivo dessa especificidade e o tipo de interação entre os α PLIs/PLA₂s ainda não foi elucidado. A característica mais comum entre os α PLIs é a presença de um domínio em suas sequências, homólogo ao domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) de lectinas Ca²⁺-dependentes (tipo C), representada pela proteína ligante de manose e apoproteína surfactante pulmonar SP-A e receptores tipo-M para PLA₂s 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 β PLIs, 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 α 2-glicoproteína humana (OKUMURA et al., 1998). Esses inibidores inibem somente PLA₂s básicas do grupo II isoladas de peçonhas de serpentes (OKUMURA et al., 2002).

O terceiro tipo de PLI, conhecido como γ PLIs, 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 γ PLIs 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 svPLA₂s, 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 PLA₂

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 PLA₂s de serpentes purificando-os e caracterizando suas estruturas bioquímica e estruturalmente.

Santos-Filho et al. (2011) isolaram um inibidor de PLA₂s do tipo-α (αPLI), de serpentes *B.alternatus* denominado αBaltMIP. Demonstraram ser este uma glicoproteína 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 α BaltMIP 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 α BaltMIP 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 (α BaltMIP) 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 PLA₂Lys49 BthTX-I e da PLA₂Asp49 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 vítima. A letalidade geral dos acidentes ofídicos é baixa (0,5%), sendo maior no acidente crotálico (1,9%) quando comparado aos demais (laquélico: 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 inválido 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 SAÚDE, 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 analgésicos para alívio da dor e deve-se levar a vítima imediatamente ao centro de saúde mais próximo para receber o tratamento antiofídico 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-laquélico (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 A₂, 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 específico 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-laquélico (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 para 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) sumarizaram 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 PLA₂, 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 fosfolípidos 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 específica 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 PLA₂ 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 isoeletrica.
- ✓ Avaliação da atividade edematogênica da miotoxina Lys49 BthTX-I e da PLA₂ Asp49 BthTX-II da peçonha de *B. jararacussu*;
- ✓ Cálculo da concentração edematogênica 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 A₂ 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 10.000xg 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°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 10.000xg 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°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 10.000xg por 10 minutos em centrífuga 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 eluídas 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 α BaltMIP oligonucleotídeos específicos sem peptídeos sinal, contendo sítios de clivagem para as enzimas *Xho*I e *Kex*2 (senso) e *Sal*I (anti-senso). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados na subclonagem do gene codificante do α BaltMIP foram:

5'-CCGCTCGAGAAAAGACATGAACAAGATCCTGATGG -3' (senso); e

5'-GCGTCGACTAAAATGAAATAAACTCACACACGAC-3' (anti-senso).

Os produtos das PCRs e o vetor de expressão para proteínas secretadas pPICZ α A (Invitrogen) foram submetidos à digestão com as enzimas *Xho*I e *Sal*I e a ligação do vetor ao gene de α BaltMIP foi feita por meio de reação com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) por 5 h a 22°C. O plasmídeo recombinante pPICZ α A- α BaltMIP foi transformado em células de *Escherichia coli* DH5 α , CaCl₂ competentes em meio LB (1% triptona, 0,5% NaCl e 0,5% extrato de levedura) contendo 25 μ g/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-inóculo 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 ressuspensas por meio de agitação manual e suave e colocadas em 100 mL de meio BMMY (1% extrato de levedura, 2% peptona,

1,34% YNB, 4×10^{-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 $1.500 \times g$ 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 analisar a pureza da proteína recombinante, em seguida foram liofilizadas e estocadas à temperatura de -20°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 voo (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°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 voo (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 isoeletrica 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 (Tetrametiletenodiamina) 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 pl (ficocianina pl 4,45; 4,65 e 4,75; β lactoglobulina B pl 5,1; anydrase carbônica bovina pl 6; anidrase carbônica humana pl 6,4; mioglobulina equina pl 6,8 e 7,0; hemoglobina A pl 7,1; hemoglobina C pl 7,5; lentil lectina pl 7,8, 8,0 e 8,2 e citocromo C pl 9,6)(BIO-RAD) foram corridos em paralelo à amostra nas mesmas condições.

Após a focalização isoeletrica, 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 C₁₈, 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 100°C. 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 PLA₂ 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 temperatura 37°C 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 contendo 15 µL de EDTA 10% e em seguida, os animais foram eutanasiados. O sangue coletado de cada animal foi centrifugado à 2.500xg por 8 minutos à temperatura ambiente em centrífuga 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 37°C por aproximadamente 1 minuto e em seguida foi adicionado 20 µL de plasma, sendo estes colocados em cubeta termostatizada à 37 °C 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 °C, 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 ° 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 $\pm$ 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 significativo.

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 °C, 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 μ L de PBS; um grupo (G2) recebeu solução de 50 μ L com toxina; um grupo (G5) recebeu solução de 50 μ L 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 °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 $\pm$ 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 significativo.

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 μ L de sangue por punção do plexo-orbital, para obtenção de soros pré-ímmes. 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 μ g do antígeno, o inibidor recombinante purificado, diluído em 150 μ L de PBS estéril e emulsificado com 150 μ L de adjuvante completo de Freund (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA), por via intraperitoneal. Após quinze dias, foi feita uma segunda imunização com 10 μ g do rBaltMIP emulsificado com adjuvante incompleto de Freund, via intraperitoneal nos mesmos animais. Posteriormente, após mais 15 dias, foi coletada uma amostra de 200 μ L 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 μ g em 50 μ L de PBS por poço, “overnight”, a 4°C. Sequencialmente, bloqueiou-se a placa com solução tampão de fosfato (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ e 1,4 mM KH₂PO₄ com gelatina 3% (Amresco, Ohio, USA), 200 μ L/poço, por 2h a 37°C. Foram, então, repetidas as etapas de lavagem com solução tampão de fosfato (137

mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ e 1,4 mM KH₂PO₄, 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 Na₂HPO₄ e 1,4 mM KH₂PO₄, gelatina 1% (Amresco, Ohio, USA) e surfactante Tween20 0,05% (Acros Organic, Bélgica). foram incubados por 1 hora a 37°C, com 50 µL de amostra por poço, em duplicata, para determinar uma curva de titulação dos soros contendo anticorpos policlonais anti-rBaIMIP.

Foi utilizado como anticorpo secundário, anticorpo de coelho anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase (HRPO: Horseradish Peroxidase Conjugated - Jackson ImmunoResearch- USA) diluído na proporção de 1:5000 (v/v) em solução tampão de fosfato (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ e 1,4 mM KH₂PO₄ 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 rBaIMIP, 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 Na₂HPO₄ e 1,4 mM KH₂PO₄ gelatina 1% (Amresco, Ohio, USA) e surfactante Tween20 0,05% (Acros Organic, Bélgica) por 1 hora a 37°C, 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°C.

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 contendo Tween 20 a 0,05% leite bovino desnatado 5%;

- **Controle negativo:** os soros pré-ímmunes, 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-ímmunes, 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 4°C, 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 ImmunoResearch-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 37° 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°C, 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 miotoxidade 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 PLA₂s-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°C 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 μ m, 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 $\pm$ 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 significativo. Todas as análises estatísticas foram calculadas utilizando o programa *GraphPad Prism 5*.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

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 A₂ 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 A₂ - 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 venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subpecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *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.; LOMONTE 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺-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 in bothropstoxin 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 somnifera*. *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.; DRENT, J.; KALK, K. H. Active site and catalytic mechanism of phospholipase A2. 1981 a.

DIJKSTRA, B.W.; KALK, K.H.; HOL, W.G.; DRENT, 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 A₂ 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 A₂ inhibitors in Brazilian *Bothrops* snakes (Viperidae, Crotalinae). *Toxicon.*, v.58, p.122-9, 2008.

FAURE, G. Natural inhibitors of toxic phospholipases A₂. *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 *BOTHRUPS 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 A₂ 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 A₂. *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 in membranotropic 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 of a myotoxic phospholipase A2 isolated from *Bothrops asper* venom on skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *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 A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, v. 42, p. 915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J.M.; THREACKSTON, 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 habitat 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 A₂ 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 A₂ 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 A₂ 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 A₂ inhibitors in the liver of a venomous snake by its own venom phospholipase A₂. *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 A₂ 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 A₂ 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 A₂. *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.; GUTIÉRREZ, J.M. Two phospholipase A₂ inhibitors from the plasma of *Cerrophidian (Bothrops) godmani* which selectively inhibit two different group II phospholipase A₂ 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 A₂ 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 A₂ 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 mucrosquamatus*. *Biochimica et Biophysica 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 A₂ 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 A₂ 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 A₂ 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 A₂ 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 A₂ 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 (PLI α) 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 A₂ 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.L.; 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 *Trimeresurus 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 palaestinae*. *Toxicon*, v. 16, p. 661-672, 1978.

OWNBY, C.L.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A₂ 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 A₂ 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 A₂ 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 A₂ 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 A₂ 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 dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis 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 A₂ 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 A₂ 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 polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, v.44, p.390-8, 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 A₂ 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 of myotoxic protein in venom from different *Bothrops* species. *Toxicon.*, v.52, p.1293-1301, 1990.

SILVA, A.M.M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THREACKSTON, R.D.G. Isolation and comparison 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.; THREACKSTON, 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 A₂ 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 phospholipases, myotoxins and phospholipases A₂ 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 analysis of BmjMIP, a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 302, p.193-200, 2003.

SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R. Phospholipases A₂ 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 A₂ 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 A₂ 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 A₂ inhibitor from python serum. Phospholipase A₂ binding and anti-inflammatory activity. *Eur. J. Biochem.*, v.269, p.719-727, 2002.

THWIN, M.M.; SAMY, R.P.; SATYANARAYANAJAIS, S.D.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Venom neutralization by purified bioactive molecules: Synthetic peptide derivatives of the endogenous PLA₂ 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 A₂ 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