Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**“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”**

Norival Alves Santos-Filho

Ribeirão Preto

2012

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**“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”**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Norival Alves Santos-Filho

Orientadora: Profa Dra Suely Vilela

Ribeirão Preto

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Santos-Filho, Norival Alves

“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, 2012.

148p.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa Dra Suely Vilela

1. *Bothrops alternatus* 2. α BaltMIP 3. rBaltMIP 4. α PLI

FOLHA DE APROVAÇÃO

Norival Alves Santos-Filho

“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”

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa Dra Suely Vilela

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho:

A minha amada família:

Meus pais Norival e Dalila,

Meus irmãos Thatty e Tiago,

Minha esposa Cláudia.

Agradecimentos

Agradeço a minha esposa Claudía, por tudo. Te amo.

Aos meus pais (Norival e Dalila), meus irmãos (Thatty e Tiago) e cunhados (Nado e Tati). Saibam que apesar da distância, estou sempre pensando em vocês.

Agradeço também aos pais (Pedro e Regina), irmão (Felipe), cunhada (Tita) e toda a família da Claudía, pela companhia, pelos bons momentos que passamos juntos e pela ajuda, sempre que necessária.

À minha orientadora, Suelly Vilela; inicialmente por ter me estendido a mão em uma hora muito importante; além disso, pela relação sempre respeitosa, pela confiança e ensinamentos.

Aos meus grandes amigos de laboratório Lucas, Tássia, Johara, Danilo e Carol. Pelo companheirismo e apoio sempre. Pessoas maravilhosas com as quais aprendi e me emocionei. Inesquecíveis.

Aos outros grandes amigos do laboratório de Toxinologia: Marco, Luiz, Tati, Raquel, Sante, Adélia, Franco, Renato, Cassio, Rafael, Wallace. Passamos bons momentos juntos. Sentirei muitas saudades....

Aos amigos que estão longe, mas não distantes, seguindo seus caminhos: Maca, Paula, Guilherme, Daiane, Hugo, Afonso, Silvana, Sabrina, Clayton, Adriana, Ivone e Lara.

Ao professor Andreimar, por todos os ensinamentos e por ter aberto a porta de seu laboratório para mim.

Ao Prof. Dr. Flávio H. Silva, ao Prof. Dr. Marcos R.M. Fontes, ao Prof. Dr. Carlos Tomich, à Profa. Dra. Consuelo L. Fortes Dias, à Profa. Dra. Cristina Nonato, ao Dr. Ângelo Magro, à Dra. Ludier Kesser, à Dra. Maria Inácio Estevão-

Costa, à Msc. Johara Boldrini-França, à Msc. Karla de Castro F. Bordon e à Msc. Carla C. Mamede, e todos os outros professores que contribuíram neste trabalho, por terem aberto as portas de seus laboratórios e pelo auxílio sempre necessário.

Aos amigos do laboratório de Toxinas Animais.

Aos amigos e funcionários da FCFRP, Regina, Ana, Rose, Rosana, Dona Evanira, funcionários do biotério e todos os outros.

A todos os meus outros amigos, estejam vocês longe ou perto sempre estarão na minha memória e coração.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

"Se Deus houvesse isentado o homem do trabalho do corpo, seus membros estariam atrofiados; se o houvesse isentado do trabalho da inteligência, seu espírito teria permanecido na infância, no estado de instinto animal; por isso, lhe fez do trabalho uma necessidade e lhe disse: Procura e acharás, trabalha e produzirás; dessa maneira, serás o filho das tuas obras, delas terás o mérito e serás recompensado segundo o que tiveres feito."

"O Evangelho Segundo o Espiritismo"

RESUMO

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.** 2012. 148 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Mionecrose é uma importante complicação médica resultante de picadas de serpentes e, em casos graves, a mionecrose local pode levar a sequelas drásticas, como a perda de tecido permanente, incapacidade ou amputação do membro. As serpentes peçonhentas e não peçonhentas possuem na corrente sanguínea, proteínas inibidoras de fosfolipases A₂ (PLA₂s), denominadas PLIs. Uma hipótese que poderia explicar a presença desses PLIs no soro de serpentes peçonhentas seria a auto-proteção contra as enzimas da própria peçonha, que eventualmente, poderiam alcançar o sistema circulatório. No presente trabalho, uma proteína inibitória (denominada α BaltMIP) que neutraliza as atividades enzimáticas e tóxicas de diversas PLA₂s de peçonhas botrópicas foi isolada do plasma da serpente *Bothrops alternatus* por cromatografia de afinidade utilizando a miotoxina BthTX-I imobilizada em resina Sepharose CNBr ativada. Essa proteína apresentou massa molecular relativa de 24.000 em condições redutoras em SDS-PAGE e maior especificidade de inibição das atividades citotóxicas e miotóxicas das PLA₂s símile Lys49 quando comparadas às atividades fosfolipásicas e anticoagulantes de PLA₂s Asp49. Além disso, foi realizada a modelagem molecular, através de análises *in silico*, tanto da estrutura terciária, quanto da quaternária da α BaltMIP. Ademais, um modelo de interação entre os alfas inibidores de miotoxinas e essas toxinas foi proposto, trazendo uma nova abordagem para o estudo com essas enzimas. Também foi realizada com sucesso a clonagem e expressão deste inibidor, denominado rBaltMIP em sua forma recombinante, sendo realizada em seguida sua caracterização bioquímica parcial. O sequenciamento N-terminal e HPLC de fase reversa mostraram que rBaltMIP foi purificado em um alto grau de pureza, apresentando 100% de identidade sequencial com o inibidor nativo. As propriedades inibitórias de rBaltMIP foram testadas frente às PLA₂s e PLA₂s-símeles. rBaltMIP foi capaz de inibir parcialmente a atividade fosfolipásica de diferentes enzimas, além de inibir a atividade miotóxica e citotóxica de diferentes PLA₂ Lys49. A expressão heteróloga de rBaltMIP possibilitará a obtenção desse inibidor em grande escala, e consequentemente, a realização de trabalhos mais aprofundados no que diz respeito à possível elucidação do mecanismo de inibição das PLA₂s de serpentes, o qual ainda não foi totalmente esclarecido. Além disso, novas informações em relação ao mecanismo de ação desses inibidores poderão ser conhecidas, na tentativa de melhor entender a aplicação destes, como novo modelo terapêutico com ação antiofídica na neutralização de diferentes tipos de PLA₂s, na suplementação da soroterapia convencional e também na interação molecular com PLA₂s.

Palavras Chave: α BaltMIP, rBaltMIP, *Bothrops alternatus*, α PLI.

ABSTRACT

Santos-Filho, N. A. **Functional and structural characterization of an α -type phospholipase A₂ inhibitor from *Bothrops alternatus*: Cloning, expression and mapping of the region responsible for its inhibitory activity.** 2012. 148 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Myonecrosis is an important medical complication resulting from snakebites and, in severe cases, local myonecrosis can lead to drastic consequences such as permanent tissue loss, disability or limb amputation. Venomous and non-venomous snakes possess proteins that inhibit phospholipases A₂ (PLA₂s) in their bloodstream, called PLIs. One hypothesis that could explain the presence of these PLIs in the serum of venomous snakes would be the self-protection against their own venom enzymes, which could eventually reach the circulatory system. In the present work, an inhibitory protein (called α BaltMIP) that neutralizes the enzymatic and toxic activities of several bothropic PLA₂s was isolated from *Bothrops alternatus* plasma by affinity chromatography using the myotoxin BthTX-I immobilized on a CNBr-activated Sepharose resin. This protein showed relative molecular mass of 24,000 under reducing conditions on SDS-PAGE and greater specificity of inhibition of the cytotoxic and myotoxic activities of Lys49 PLA₂-like enzymes compared to the anticoagulant and phospholipase activities of Asp49 PLA₂s. In addition, molecular modeling was performed by *in silico* analysis of both tertiary and quaternary structures of α BaltMIP. Furthermore, a model of interaction between alpha inhibitors of myotoxins and these toxins was proposed, bringing a new approach to the study of these enzymes. Cloning and expression of the inhibitor (called rBaltMIP in its recombinant form) were also achieved successfully, followed by its partial biochemical characterization. N-terminal sequencing and reverse phase HPLC showed that rBaltMIP was purified in a high purity degree, with 100% sequence identity with the native inhibitor. The inhibitory properties of rBaltMIP were tested against PLA₂s and PLA₂-like enzymes. rBaltMIP was able to partially inhibit the phospholipase activity of different enzymes, also inhibiting the cytotoxic and myotoxic activity of different Lys49 PLA₂-like enzymes. Heterologous expression of rBaltMIP should help obtaining such inhibitor in large-scale, and consequently, the performance of further studies on the mechanism of inhibition of PLA₂s, which has not yet been fully clarified. In addition, new information regarding the mechanism of action of these inhibitors may be known, in an attempt to better understand the application of these proteins as new therapeutic models with antiophidian action in neutralizing different types of PLA₂s, the supplementation of conventional serum therapy and also in the molecular interaction with PLA₂s.

Keywords: α BaltMIP, rBaltMIP, *Bothrops alternatus*, α PLI.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Purificação das PLA ₂ s Asp49 e PLA ₂ s-símile Lys49	37
Figura 2: Purificação do inibidor de fosfolipase A ₂ tipo α	40
Figura 3: Comparação da sequência de aminoácidos da região N-terminal de α BaltMIP com outros PLIs de serpentes	41
Figura 4: Espectro de dicroísmo circular (DC) em <i>Far UV</i> para α BaltMIP, PLA ₂ s e a associação entre α BaltMIP/PLA ₂ s	43
Figura 5: Caracterização das propriedades inibitórias de α BaltMIP frente à atividade fosfolipásica de diferentes PLA ₂ s Asp49	46
Figura 6: Atividade de inibição das atividades anticoagulantes das PLA ₂ s Asp49 BthTX-II	48
Figura 7: Neutralização das atividades miotóxica e citotóxica induzida pelas miotoxinas BthTX-I, PrTX-I, PrTX-III e BthTX-II	50
Figura 8: Sequência de cDNA e sequência deduzida de aminoácidos de α BaltMIP	53
Figura 9: Alinhamento múltiplo entre as sequências de resíduos de aminoácidos de α BaltMIP e outras sequências de α PLIs e SP-D	54
Figura 10: Representações dos modelos teóricos de α BaltMIP obtidos por diferentes programas	56
Figura 11: Análise dos modelos do α BaltMIP realizada pelo programa VERIFY 3D	58
Figura 12: Análise dos modelos do α BaltMIP realizada pelo programa WHAT IF ...	60
Figura 13: Diagrama de Ramachandran do modelo 1	62
Figura 14: Diagrama de Ramachandran do modelo 2	64
Figura 15: Diagrama de Ramachandran do modelo 3	65
Figura 16: Representação do modelo teórico do α BaltMIP final obtido após simulação de dinâmica molecular	67
Figura 17: Representação do modelo teórico do α BaltMIP, nomeado como Trímero 1	69
Figura 18: Representação do modelo teórico do α BaltMIP, nomeado como Trímero 2	70
Figura 19: Representação do modelo teórico do α BaltMIP, nomeado como Trímero 3	71
Figura 20: Comparativo das análises da qualidade da estrutura terciária dos trímeros do α BaltMIP	73
Figura 21: Diagrama de Ramachandran do estrutural do Trímero 1	75

Figura 22: Diagrama de Ramachandran do estrutural do Trímero 2	76
Figura 23: Diagrama de Ramachandran do estrutural do Trímero 3	77
Figura 24: Trimerização hipotética do α BaltMIP	80
Figura 25: Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da PCR dos cDNAs correspondentes ao α BaltMIP	82
Figura 26: Características do vetor de expressão pPICZ α	84
Figura 27: Análise da PCR de colônias de <i>E. coli</i> transformadas com o vetor pPICZ α A – α BaltMIP	86
Figura 28: Gel de agarose 1% do plasmídio recombinante pPICZ α A- α BaltMIP	88
Figura 29: Análise do PCR de colônias de <i>P. pastoris</i> transformadas com o vetor pPICZ α A - α BaltMIP linearizado	90
Figura 30: Triagem em placa da expressão do α BaltMIP recombinante em <i>P. pastoris</i>	92
Figura 31: Purificação do rBaltMIP	94
Figura 32: Caracterização das estruturas primária e secundária do rBaltMIP	95
Figura 33: Caracterização da inibição de diferentes PLA ₂ s Asp49 por rBaltMIP	97
Figura 34: Neutralização da atividade citotóxica	99
Figura 35: Neutralização da atividade miotóxica das miotoxinas Lys49 e Asp49 ...	101
Figura 36: Neutralização da atividade miotóxica das miotoxinas Lys49 e Asp49 30 minutos após a injeção das miotoxinas no músculo gastrocnêmio	103
Figura 37: Análise histopatológica do músculo gastrocnêmio de camundongos	105
Figura 38: Estruturas da BthTX-I e do α BaltMIP, obtida pelo estudo de <i>docking</i> macromolecular	108
Figura 39: Resíduos que podem sofrer interações de acordo com o estudo de <i>docking</i> macromolecular	109
Figura 40: Diferentes modos de dimerização propostos para as miotoxinas Lys49 PLA ₂ s homólogas	125
Figura 41: Modelos propostos para o sítio miotóxico das miotoxinas Lys49	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de deconvolução das proteínas PLA ₂ CB, BthTX-I, BthTX-II e seus complexos com α BaltMIP	44
---	----

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 – Botropstoxina I, fosfolipase A₂ básica, isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*

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*

CK – creatina cinase

DC – dicroísmo circular

DMSO – dimetil-sulfóxido

DTT – ditionitrito

EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético

Mr – massa molecular relativa

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

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS – salina tamponada em fosfato

PCR – reação em cadeia de polimerase

PLA₂s - fosfolipases A₂

PLIs – Inibidores de fosfolipases A₂

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

RPML – meio de cultura do “**Roswell Park Memorial Institute**”, Gibco-BRL

rt-PCR – PCR em tempo real

SBF – soro bovino fetal

SD – “*Standard Deviation*” - Desvio padrão

SDS – dodecil sulfato de sódio

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

TFA – ácido trifluoracético

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Ofidismo	1
1.2	Fosfolipases A ₂ (PLA ₂ s)	4
1.3	Miotoxinas	6
1.4	Inibidores de PLA ₂ s (PLIs)	8
1.5	PLIs provenientes do plasma de serpentes	10
1.6	Complementação da soroterapia antiofídica	15
2.	OBJETIVOS	16
3.	MATERIAIS e MÉTODOS	18
3.1	Animais	18
3.2	Materiais	18
3.3	Plasma humano	19
3.4	Peçonhas	19
3.5	Métodos	20
3.5.1	Isolamento das Miotoxinas	20
3.5.2	Isolamento do Inibidor	21
3.5.3	Determinação quantitativa de proteínas	23
3.5.4	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida e Determinação do Peso Molecular	23
3.5.5	Sequenciamento N-terminal	24
3.5.6	Espectroscopia de dicroísmo circular	24
3.5.7	Espalhamento dinâmico de luz	25
3.5.8	Neutralização da atividade fosfolipásica	26
3.5.9	Neutralização da atividade Anticoagulante	26
3.5.10	Neutralização da Miotoxicidade	27

3.5.11	Análise histopatológica das fibras musculares.....	27
3.5.12	Neutralização da Citotoxicidade.....	28
3.5.13	Extração de RNA e síntese do DNA	28
3.5.14	Clonagem de cDNA e sequenciamento de α BaltMIP	29
3.5.15	Seleção e alinhamento das sequências homólogas	30
3.5.16	Modelagem molecular da proteína.....	30
3.5.17	Avaliação do melhor modelo estrutural	30
3.5.18	Simulações de dinâmica molecular.....	31
3.5.19	Avaliação do modelo estrutural teórico de α BaltMIP e montagem da estrutura hipotética oligomérica	31
3.5.20	Análise de docking molecular e mapeamento da possível região de interação rBaltMIP/Lys49 PLA ₂ s-símile.....	32
3.5.21	Expressão do rBaltMIP em <i>Pichia pastoris</i>	33
3.5.22	Análise estatística dos resultados.....	35
4.	<i>RESULTADOS</i>	36
5.	<i>DISCUSSÃO</i>	110
6.	<i>CONCLUSÕES</i>	131
7.	<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	134

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ofidismo

Os acidentes causados por serpentes peçonhentas representam significativo problema de Saúde Pública, especialmente em países tropicais, pela frequência com que ocorrem e pela mortalidade que ocasionam (PINHO; PEREIRA, 2001).

Existem no mundo aproximadamente 2700 espécies de serpentes, das quais, um quinto são consideradas peçonhentas (MEBS, 2002). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2012, foram notificados 157.986 acidentes, o que representa uma média de 26.331 casos/ano para o país, sendo que, somente no ano de 2012, foram registrados 12.348 acidentes por animais peçonhentos. Das notificações no último ano analisado, quando o gênero da serpente envolvida foi especificado, 8.875 (71,8%) dos acidentes foram ocasionados por serpentes do gênero *Bothrops*, envolvendo 48 óbitos somente no ano de 2012. O acidente ofídico acomete, com maior frequência, adultos jovens do sexo masculino durante o trabalho na zona rural (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Em 2009 Fenwick e colaboradores propuseram uma nova classificação das espécies do gênero *Bothrops* de diversas serpentes. Segundo esses autores, as espécies do gênero *Bothrops* possuem grandes variáveis em relação à ecologia e geografia, principalmente em comparação com outros gêneros de serpentes. Neste trabalho, o gênero *Bothrops*, com base em estudos taxonômicos, filogenéticos, morfológicos e de biologia celular, foi dividido em *Bothropoides* (como por exemplo *Bothropoides pauloensis*); *Rhinocerothis* (Como a serpente *Rhinocerothis alternatus*); e *Bothrops* (*Bothrops moojeni*). Contudo, como a comunidade científica ainda está se adaptando a essa nova classificação [por exemplo, quando pesquisado sobre “alternatus” no portal Pubmed, 30 entradas são encontradas desde 2009 e apenas 2 citam o termo *Rhinocerothis* (www.pubmed.com)] e como o portal do ministério da Saúde e Sisan (<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>) também não utilizam essa classificação optamos, no presente trabalho, pelo uso do termo *Bothrops* para o gênero da serpente *Bothrops alternatus*.

Seguindo a classificação antiga, dentre as famílias de serpentes existentes no Brasil, são quatro os gêneros de serpentes peçonhentas: *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu, caíçaca), *Crotalus* (cascavel), *Lachesis* (surucucu) e *Micrurus* (coral-verdadeira). As serpentes deste gênero compreendem cerca de 30 espécies, distribuídas por todo território nacional. Uma das espécies mais conhecidas são as *Bothrops alternatus*, popularmente conhecida como “Urutu” ou “Urutu cruzeira”, a qual está distribuída principalmente ao sul do país, nos estados de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do sul. Essa serpente é característica pelo padrão de cor, possui manchas “em forma de ferradura” no dorso, enquanto a parte inferior de seu corpo é esbranquiçada ou creme. Essas serpentes são agressivas, possuindo hábitos noturnos ou crepusculares e vivem em ambientes úmidos como matas ou plantações (TOKARNIA; PEIXOTO, 2006).

A sazonalidade é característica marcante, relacionada a fatores climáticos e a atividade humana no campo, que determina um predomínio de incidência nos meses quentes e chuvosos, em indivíduos do sexo masculino e faixa etária de 15 a 49 anos. A letalidade geral é baixa (0,4%), maior no acidente crotálico (1,9%) em relação aos demais (laquélico: 0,9%, botrópico e elapídico: 0,3%). Por outro lado, a frequência de sequelas, relacionada a complicações locais, é bem mais elevada, situada em torno de 10% nos acidentes botrópicos, 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).

É interessante ressaltar que essas sequelas, principalmente as que levam à perda parcial ou amputação de total de membros, além de serem um problema de saúde pública, são um problema social, pois pode levar o indivíduo acometido por esse problema à diversos transtornos, dentre eles à invalidez no trabalho.

As peçonhas de serpentes são, provavelmente, as mais complexas de todas as peçonhas animais conhecidas, contendo 20 ou mais componentes diferentes, sendo 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, lipídeos, metais, aminoácidos livres, nucleotídeos, entre outros (VARANDA; GIANINNI, 1999).

Os componentes das peçonhas de serpentes incluem citotoxinas, cardiotoxinas, fatores de crescimento de nervos, lectinas, inibidores enzimáticos e várias enzimas, como fosfolipases A_2 (PLA₂s), metaloproteases, serinoproteases, fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, L-aminoácido oxidases, catalases, ATPases, hialuronidases, etc (TU, 1996).

1.2 Fosfolipases A₂ (PLA₂s)

As fosfolipases A₂ (PLA₂s; E.C.3.1.1.4) são enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídeos. Estas enzimas catalisam especificamente a hidrólise de fosfolipídeos na ligação éster do carbono 2, liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos, em uma reação dependente de cálcio (ARNI; WARD, 1996; KUDO; MURAKAMI, 2002). As PLA₂s apresentam um importante papel em várias funções celulares incluindo manutenção dos fosfolipídeos celulares, geração de prostaglandinas (PG) e leucotrienos, proliferação celular e contração muscular. Além disso, sabe-se que estas enzimas estão envolvidas em processos inflamatórios humanos (DENNIS et al., 1991).

Estas enzimas são amplamente distribuídas na natureza e apresentam elevado interesse médico-científico dado ao seu envolvimento em várias doenças inflamatórias humanas e em envenenamentos por serpentes e abelhas. São encontradas em uma variedade de fluídos biológicos e células, como bactérias, plantas, tecidos de mamíferos (pulmão, fígado, baço, coração), eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleados. No entanto, as mais conhecidas e amplamente estudadas são aquelas encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos e nas peçonhas de répteis e insetos (DENNIS, 1994; SOARES; GIGLIO, 2003; SOARES et al., 2004a;b).

As PLA₂s constituem uma superfamília de diferentes enzimas pertencentes a 15 grupos e seus subgrupos, as quais estão divididas em cinco grandes tipos distintos: - PLA₂s secretadas (sPLA₂), dentre estas as PLA₂ encontradas em peçonhas de serpentes, as quais possuem enzimas classificadas entre os grupos I a XIV; - PLA₂s citosólicas (cPLA₂), classificadas unicamente no grupo IV; - PLA₂s Ca²⁺ independentes (iPLA₂), distribuídas somente no grupo VI; - fatores ativadores de plaquetas acetil-hidrolases (PAF-AH), classificadas no grupo VII e VIII e - PLA₂s lisossomais, as quais pertencem ao grupo XV (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). O sistema de classificação agrupa as PLA₂s considerando a origem, sequência de aminoácidos, mecanismos catalíticos, características bioquímicas adicionais, funcionais e estruturais.

As PLA₂s provenientes de peçonhas de serpentes (svPLA₂s) estão classificadas no grupo I e II, sendo que as enzimas das peçonhas de serpentes da

família Viperidae, estão classificadas no grupo IIA (SIX; DENNIS, 2000; SOARES et al., 2004a,b; RODRIGUES et al., 2004). As svPLA₂s pertencentes ao grupo IIA, foram divididas em subgrupos, dos quais destacam-se: (i) PLA₂s Asp49, enzimas que usualmente apresentam alta atividade catalítica, e (ii) PLA₂s símeles (ou homólogas) Lys49 com baixa ou nenhuma atividade enzimática sobre substratos artificiais, entretanto, com alta atividade miotóxica (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997; OWNBY et al., 1999; SOARES et al., 2004a).

Como citado anteriormente, peçonhas de serpentes são ricas fontes de fosfolipases A₂ e essas enzimas possuem uma grande variedade de efeitos farmacológicos e/ou tóxicos, como miotóxico, anticoagulante, inibição de agregação plaquetária, neurotóxico, cardiotoxico, hipotensor e indutor de edema (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997; HARRIS et al., 2000; SINGH et al., 2000; SOARES et al., 2004a,b; SANTOS-FILHO et al., 2008).

As svPLA₂ ainda não foram claramente caracterizadas, fazendo com que nos últimos anos crescesse o interesse em seus estudos. Várias pesquisas têm sido realizadas para um melhor entendimento de seus mecanismos de ação. A maioria das PLA₂s isoladas e descritas até então são proteínas básicas com pI variando entre 7 a 10. Por exemplo, a Piratoxina III (PrTX-III) purificada a partir da peçonha de *Bothrops pirajai* (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002), uma Asp49 com ponto isoelétrico de 8,5 e massa molecular de 13.867 Da, a qual apresenta atividade catalítica sobre fosfolipídeos, além de apresentar também atividade miotóxica e anticoagulante (TOYAMA et al., 1999). Outro exemplo clássico de enzimas PLA₂ é o componente básico (CB) do complexo crotoxina (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971), isolada da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*, uma PLA₂ Asp49 básica, cataliticamente ativa a qual apresenta também atividade anticoagulante. Essa enzima possui 122 resíduos de aminoácidos e Mr de 14.100. Outra PLA₂ purificada a partir de peçonha de serpente do gênero *Bothrops* é a BthA-I-PLA₂, isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*, sendo uma enzima ácida, com ponto isoelétrico de 4,5 e massa molecular de 13.700 Da (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002). Várias outras PLA₂s já foram isoladas e caracterizadas, sendo que, pode-se observar similaridades significantes em suas estruturas tridimensionais, embora demonstrem diferentes propriedades farmacológicas, o que torna primordial o estudo dos seus mecanismos de ação e principalmente, as suas funções no envenenamento.

1.3 Miotoxinas

De acordo com Lomonte e colaboradores (2003), miotoxinas podem ser definidas como componentes naturais (geralmente proteínas pequenas e peptídeos) de peçonhas, que induzem danos irreversíveis às fibras musculares esqueléticas (mionecrose) após injeção em animais. Algumas miotoxinas agem localmente, danificando fibras musculares no local da injeção, enquanto outras agem sistemicamente, causando lesão muscular em locais distantes. Mionecrose é uma importante complicação médica proveniente de picadas de serpentes e, em casos graves, a mionecrose local pode levar a sequelas drásticas, como a perda de tecido permanente, incapacidade ou amputação do membro (OTERO et al, 2002). Por outro lado, a miotoxicidade sistêmica generalizada (rabdomiólise) pode levar a mioglobinúria e insuficiência renal aguda (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985), uma causa frequente de morte em vítimas de envenenamento.

As miotoxinas descritas em peçonhas animais podem ser classificadas em três grupos principais (HARRIS; CULLEN, 1990) incluindo: (1) pequenas moléculas com atividade miotóxica, por exemplo, a crotamina, purificada da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*; (2) cardiotoxinas e (3) enzimas PLA₂s, como a Bothropstoxina II (BthTX-II), purificada a partir da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu* e PLA₂s símiles Lys49 e Bothrops toxina I (BthTX-I), também purificada a partir da serpente *Bothrops jararacussu*. As miotoxinas PLA₂s e PLA₂s-símile formam o maior grupo das miotoxinas purificadas a partir de peçonhas animais (principalmente peçonhas de serpentes) (LOMONTE et al., 2003).

Como citado anteriormente, as PLA₂s provenientes de peçonhas de serpentes são divididas em subgrupos, dos quais destacam-se: (i) PLA₂s Asp49, enzimas que usualmente apresentam alta atividade catalítica, e (ii) PLA₂s homólogas Lys49 com baixa ou nenhuma atividade enzimática sobre substratos artificiais (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997; OWNBY et al., 1999; SOARES et al., 2004a). Esses subgrupos de PLA₂s possuem exemplares com atividades miotóxicas, sendo que, as PLA₂s-símile são de grande interesse para a pesquisa, pois como não apresentam atividade catalítica e suas propriedades miotóxicas são provavelmente provenientes de outros mecanismos de ação, independentes da hidrólise de fosfolípidos.

Na busca de se elucidar qual a região dessas PLA₂s-símile Ly49 seria responsável por essas atividades tóxicas (já que elas não possuem atividade catalítica, sugeriu-se que essas atividades eram independentes do sítio catalítico dessas moléculas), alguns segmentos dessas moléculas foram sintetizados e testados, demonstrando que um sítio de ligação de heparina na porção C-terminal dessas proteínas, na região entre os resíduos de aminoácidos 115-129 (numeração de RENETSEDER et al., 1985), poderia ser o responsável por essa toxicidade (LOMONTE et al., 1994).

Além disso, outros trabalhos têm demonstrado ainda mais a importância dessa região da molécula na atividade tóxica dessas Lys49 PLA₂-símile, sendo composta principalmente por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos (por exemplo, a região entre os resíduos 115-129 da miotoxina II proveniente da peçonha da serpente *Bothrops atrox*, correspondente à sequência KKYRYYLKPLCKK), sobretudo na atividade citotóxica (LOMONTE et al., 2003; LOMONTE; ÂNGULO; MORENO, 2010; CINTRA-FRANCISCHINELLI et al., 2010; SANTOS-FILHO et al., 2011) e atividade de mionecrose *in vivo* (NÚÑEZ et al., 2001; LOMONTE et al., 2003).

A necrose muscular é um efeito local relevante, induzido por muitas peçonhas de serpentes, podendo levar a uma perda permanente do tecido e da habilidade, requerendo a amputação do membro atingido (NISHIOKA; SILVEIRA, 1992). É sabido que essa necrose observada nos envenenamentos é causada por miotoxinas presentes nas peçonhas das serpentes.

Atualmente, o principal tratamento das vítimas de envenenamentos de serpentes é realizado através da administração intravenosa do soro antiofídico específico, derivado de equinos. 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 da peçonha que possuem uma alta toxicidade, mas uma baixa imunogenicidade (fosfolipases A₂, por exemplo), não induzindo resposta imune em equinos, o que torna o soro pouco eficaz contra essas enzimas. Dessa forma, a busca de inibidores de toxinas de peçonhas de serpentes é de extrema importância para a produção de antivenenos mais eficientes ou para a complementação da soroterapia atualmente utilizada.

1.4 Inibidores de PLA₂s (PLIs)

É de conhecimento popular e científico que peçonhas e toxinas de peçonhas de serpentes são neutralizadas por diversos compostos, entre eles: anticorpos monoclonais e policlonais, agentes químicos, agentes sintéticos e compostos de origem animal e vegetal (BORGES et al., 2001; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003; SOARES et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; MARCUSSI et al., 2007).

Dois exemplos consagrados na literatura científica de agentes químicos, que são capazes de inibir a ação de PLA₂s e miotoxinas são a heparina de baixo peso molecular e o Brometo de p-bromofenacila (BPB). A heparina é um polissacarídeo aniônico natural que se liga à região catiônica e hidrofóbica (região ligante de heparina) localizada na porção C-terminal de miotoxinas inibindo a atividade miotóxica e citotóxica dessas macromoléculas (SOARES et al., 2000; STÁBELI et al., 2006). Já o BPB, um inibidor sintético de PLA₂s, age se ligando covalentemente à His48 do sítio catalítico dessas enzimas, inibindo assim sua atividade. A alquilação do resíduo His48 pelo BPB promove a perda total ou parcial da atividade de hidrólise de fosfolípidos e adicionalmente pode induzir à diminuição dos efeitos tóxicos (SOARES; GIGLIO, 2003; MAGRO et al., 2005; MARCUSSI et al., 2007).

Além disso, várias plantas são popularmente usadas contra envenenamentos por serpentes. O uso de extratos de plantas como antídoto para envenenamentos por serpentes é uma opção antiga de muitas comunidades carentes, que não têm acesso rápido à soroterapia.

Observando o conhecimento popular, alguns cientistas estão estudando diversos extratos de plantas, em busca de compostos que podem neutralizar as toxinas de peçonhas de serpentes. Nesses estudos, algumas plantas têm demonstrado ação antiofídica, com biomoléculas capazes de neutralizar ou inibir parcialmente diversos efeitos locais e sistêmicos induzidos por diferentes peçonhas de serpentes (MORS et al., 2000; SOARES et al., 2005; SAMY et al., 2008, DA SILVA et al., 2005; 2007, DA SILVA et al., 2012). São exemplos de plantas com ação antiofídica: erva-botão (*Eclipta prostrata*) (MELO et al., 1994; MELO; OWNBY, 1999), guaçatonga (*Casearia sylvestris*) (BORGES et al., 2000; CAVALCANTE et al., 2007), gloriosa (*Gloriosa superba*) (SAMY et al., 2008), erva-baleeira (*Cordia*

verbenacea) (TICLI et al., 2005) e pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*) (OLIVEIRA et al., 2005), Pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) (DA SILVA et al., 2005; 2007), agrião-do-brejo (*Eclipta Alba*) (DIOGO et al., 2009), fruta-de-sabão (*Sapindus saponaria*) (DA SILVA et al., 2012), entre outras.

Além disso, alguns inibidores de PLA₂s podem ser encontradas em outros organismos. Um exemplo é o Manoalide (A), um sesquiterpeno não-esteróide purificado a partir da esponja marinha *Luffariella variabilis*, o qual resultou no manoalide (B) sintetizado artificialmente com base em seu análogo natural. Estudos demonstraram que estes compostos promoveram efeitos inibitórios irreversíveis sobre PLA₂s de várias serpentes, abelhas e mamíferos (LOMBARDO; DENNIS 1985; REYNOLDS, et al., 1991; MARCUSSI et al., 2007).

Além destes agentes neutralizadores de peçonhas de serpentes citados anteriormente, existem alguns exemplos de inibidores obtidos do soro de animais como, por exemplo, o complexo antibotrópico (CAB) de *Didelphis albiventris* e *D. marsupialis* (SOARES et al., 1997; TRENTON et al., 2001; ROCHA et al., 2002), e os inibidores isolados de plasma de serpentes (OHKURA et al., 1993; FORTES-DIAS et al., 1994; PERALES et al., 1995; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003; SOARES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008; 2011; SANTOS-FILHO et al., 2011). Devido a esses fatores, diversas pesquisas têm sido realizadas em busca de inibidores naturais de PLA₂s de serpentes.

1.5 PLIs provenientes do plasma de serpentes

As serpentes peçonhentas e não peçonhentas possuem proteínas inibidoras de PLA₂s, denominadas PLIs, em seu soro sanguíneo (MARCUSI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008). Uma hipótese que poderia explicar a presença desses PLIs no soro de serpentes peçonhentas seria a auto-proteção contra as enzimas da própria peçonha, que eventualmente, poderiam alcançar o sistema circulatório (FAURE, 2000; FORTES-DIAS, 2002; MARCUSI et al., 2007).

Estas proteínas inibidoras de PLA₂s parecem ser produzidas no fígado das serpentes, como indicado pela análise de Northern blot e RT-PCR de material genético extraído de diferentes tecidos (NOBUHISA et al., 1997; LIZANO et al., 2000; OKUMURA et al., 1998, 2002; PERALES et al., 2002). Essa produção dos PLIs no fígado da serpente (e não nas glândulas de peçonha ou outro órgão) faz com que esses inibidores caiam na circulação sanguínea, já que o fígado é o principal órgão produtor de proteínas plasmáticas, melhorando e acelerando o mecanismo de proteção contra envenenamento acidental da própria serpente. No entanto, esta hipótese não explica a presença de PLIs no soro de serpentes não peçonhentas (DUNN et al., 2001).

Até o momento, para o isolamento dos inibidores de PLA₂s descritos na literatura, foram utilizados dois diferentes métodos. Uma dessas metodologias de purificação consiste no método de cromatografia por bioafinidade, a qual se baseia na imobilização de diferentes proteínas, neste caso PLA₂s (como por exemplo BthTX-I e BthTX-II), em fase móvel, sendo a mais comumente utilizada a resina de sepharose, previamente ativada com brometo de cianogênio (OLIVEIRA et al., 2008; SANTOS-FILHO et al., 2011). Outro método utilizado na purificação desses PLIs provenientes de plasma de serpentes foi uma sequência de passos bioquímicos, como a filtração em gel, troca iônica e cromatografia hidrofóbica (FAURE, 2000).

O sangue da serpente, utilizado para a separação do plasma, normalmente é coletado por punção cardíaca, através da veia caudal ou após a decapitação da serpente. Vale ressaltar que nos últimos anos tem crescido a preocupação com a ética no uso de animais e por isso, o método menos agressivo e que não necessita do sacrifício do animal é o método de coleta do sangue da veia caudal da serpente,

sendo assim o mais indicado. Após a coleta do sangue, o plasma é separado e liofilizado para então ser armazenado. Durante a purificação, a atividade inibitória desses PLIs é monitorada por ensaios enzimáticos baseados na inibição das atividades das PLA₂s e miotoxinas, dependendo do inibidor de interesse (RADVANYI et al., 1989; FAURE et al., 2000).

Diferentes PLIs foram purificados a partir do plasma de diferentes espécies de serpentes, e suas estruturas primárias foram determinadas (FAURE et al., 2000; DUNN et al., 2001; FORTES-DIAS, 2002; MARCUSSI et al., 2007). Estes inibidores protéicos encontram-se no sangue destes animais mesmo antes de uma possível exposição aos componentes da peçonha. São glicoproteínas oligoméricas, globulares e ácidas, as quais formam complexos solúveis com PLA₂s e miotoxinas, assim, inibindo a ação enzimática (OVADIA; KOCHVA, 1977; DOMONT; PERALES; MOUSSATCHÉ, 1991; THWIN; GOPALAKRISHNAKONE, 1998; DUNN; BROADY, 2001; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003).

Os inibidores de PLA₂s, provenientes do plasma de serpentes, podem ser classificados em três tipos: α , β e γ de acordo com aspectos estruturais. No entanto, ainda não são conhecidos os seus mecanismos de ação inibitória, necessitando-se de maiores informações em nível estrutural e funcional (THWIN et al., 2002; THWIN et al., 2010).

Os inibidores do tipo alfa (α PLIs) isolados do plasma de serpentes, 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 constituídas por mais de duas subunidades e possuem similaridade estrutural com o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) das lectinas tipo-C (INOUE et al., 1997) e da proteína surfactante pulmonar (SANTOS-FILHO et al., 2011). Além disso, esses α PLIs, principalmente os purificados a partir de plasma de serpentes do gênero *Bothrops*, possuem 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 (INOUE et al., 1997; SANTOS-FILHO, et al., 2011). Esta região abrange aproximadamente 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).

Nobuhisa e colaboradores (1998), através de mutagênese sítio dirigida observaram que a região CRD do α PLI de *T. flavoviridis* seria necessária para a ligação do inibidor com PLA₂s homólogas da mesma serpente, mostrando a relevância dessa região no possível mecanismo de ação dos inibidores α PLI. Além disso, evidências do importante papel do CRD na ligação com PLA₂s se dá com o estudo de outros ligantes dessas proteínas, como o receptor tipo M de mamíferos, o qual também contém a região CRD e se liga a várias PLA₂s de diferentes classes.

Estudos com receptores de PLA₂s tipo M de coelhos têm mostrado que domínios CRD são responsáveis pela ligação com PLA₂s (LAMBEAU et al., 1990). Também foi mostrado que outra proteína solúvel com domínio CRD, a proteína surfactante pulmonar A de mamíferos (SP-A), inibiu uma PLA₂ da peçonha da serpente *T. flavoviridis* (FISHER et al., 1994).

Em contraste com a característica das lectinas do tipo C, a ligação da CRD dos α PLIs com seus respectivos ligantes é Ca²⁺-independente (OHKURA et al., 1993). Isso se reflete também pela falta de resíduos de aminoácidos essenciais para a ligação do Ca²⁺ nas regiões CRD de α PLIs (SANTOS-FILHO et al., 2011). Além disso, vários estudos têm mostrado que a porção de carboidratos presente nos α PLIs não é necessária para a ligação com as PLA₂s (LIZANO et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2008).

Por todos esses dados apresentados anteriormente, acreditavam-se que o mecanismo pelo qual α PLIs neutralizavam o efeito tóxico das PLA₂s de peçonhas de serpentes seria inteiramente dependente da região CRD, em particular CRD4, a qual

reconheceria e se ligaria à enzima, assim prevenindo sua atividade enzimática sobre membranas celulares (LIZANO et al., 1997).

Atualmente, após vários estudos *in silico* e de mutações sítio-dirigidas, acredita-se que a região N-terminal dos α PLIs, principalmente a região correspondente entre os resíduos 13-36 (chamada de região pescoço), é de extrema importância para a manutenção das propriedades inibitórias dessas moléculas (OKUMURA et al., 2005; NISHIDA et al., 2010; SANTOS-FILHO et al., 2011). Entretanto não há dados até o momento que indiquem ao certo qual a região de interação desses inibidores com as PLA₂s e pesquisas adicionais devem ser realizadas para uma maior compreensão desse mecanismo de ação.

Os β PLIs, uma outra classe de PLIs, já foram isolados das espécies de serpentes *Agkistrodon blomhoffii siniticus* (OKUMURA et al., 1998) e *Elaphe quadrivirgata* e *E. climacophora* (OKUMURA et al., 2002; SHIRAI et al., 2009), as quais pertencem a família Viperidae e Colubridae, respectivamente. Esses inibidores possuem estruturas com repetições ricas em leucina e demonstram similaridade com a α 2-glicoproteína humana (OKUMURA et al., 1998). β PLIs inibem somente PLA₂s básicas do grupo II isoladas de peçonhas de serpentes (OKUMURA et al., 2002).

O terceiro tipo de PLIs, conhecido como γ PLIs é o mais encontrado até o momento. Os γ PLIs são glicoproteínas ácidas com massa de 90-130 kDa compostos por 3-6 subunidades não covalentes de massa 20-31 kDa. Suas 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). Este tipo de inibidor foi relatado em diferentes serpentes, como *Crotalus durissus terrificus* (FORTES-DIAS et al., 1994; PERALES et al., 1995), *Naja naja kaouthia* (OHKURA et al., 1994a;b), *Agkistrodon blomhoffii siniticus* (OHKURA et al., 1997), *Trimeresurus flavoviridis* (NOBUHISA et al., 1997), *Laticauda semifasciata* (OHKURA et al., 1999), *Elaphe quadrivirgata* e *E. climacophora* (OKUMURA et al., 1999; SHIRAI et al., 2009), *Cerrophidion godmani* (LIZANO et al., 2000), *Notechis ater* (HAINS et al., 2000), *Notechis ater serventyi* (HAINS; BROADY, 2000), *Oxyuranus scutellatus* (HAINS; BROADY, 2000), *Oxyuranus microlepidotus* (HAINS; BROADY, 2000), *Pseudonaja textilis* (HAINS; BROADY, 2000), *Python reticulatus* (THWIN et al., 2000), *Notechis scutatus* (HAINS et al., 2001), *Lachesis muta muta*

(FORTES-DIAS et al., 2003), *Protobothrops flavoviridis* (SO et al., 2008), *Bothrops alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008) e *Bothrops jararacussu* (OLIVEIRA et al., 2011), sendo que esses γ PLIs parecem ser menos específicos, já que inibem PLA₂s dos grupos I, II e III (INOUE et al., 1997; OHKURA et al., 1999; OKUMURA et al., 1999).

Dessa forma, considerando a gravidade do envenenamento causado principalmente pelas miotoxinas, a baixa imunogenicidade dessas moléculas, a inespecificidade do soro antiofídico sobre essas toxinas e consequente baixa neutralização dos efeitos locais do envenenamento pelo soro, entre outros fatores, o estudo dos inibidores plasmáticos torna-se extremamente importante, devido às possíveis aplicações clínicas como, por exemplo, na complementação da soroterapia normalmente usada em casos de envenenamentos. Além disso, estes inibidores podem ser usados como ferramentas biológicas em estudos moleculares, com aplicações na indústria biotecnológica, estudos de mecanismo de ação de peçonhas, designers de inibidores sintéticos e compreensão de outras características de miotoxinas.

1.6 Complementação da soroterapia antiofídica

Inicialmente, é interessante ressaltar que a produção de antiveneno específico foi iniciada por Vital Brazil por volta do ano 1900. Foi Vital Brazil quem também descobriu a eficácia do soro antiofídico polivalente (BRAZIL, 1907). Nesta época, o soro antiofídico era preparado do plasma bruto dos animais hiperimunizados. Contudo, como posteriormente foi descoberto que os anticorpos (imunoglobulinas) demonstram serem as moléculas ativas responsáveis pela ação terapêutica do antiveneno essas começaram a ser purificadas e utilizadas no soro antiofídico. Subsequentemente, as imunoglobulinas, ou fragmentos de imunoglobulina (F (ab')₂), purificadas a partir de soro foram usadas no antiveneno (OMS, 2008).

Outro fato interessante é que apesar dos avanços na produção do soro antiofídico, essa produção ainda é semelhante aos métodos originalmente descritos por Vital Brazil. Embora a soroterapia reverta com bastante eficácia os efeitos sistêmicos da peçonha no organismo da vítima, conseguindo evitar por muitas vezes o óbito, ela apresenta algumas desvantagens como uma série de efeitos colaterais (choque anafilático e doença do soro, por exemplo). A ineficiência no combate dos efeitos locais do envenenamento (aumentando as chances de deixar sequelas no membro atingindo) e a necessidade de cuidados com a estocagem do soro e com o prazo de validade também são outros fatores limitantes (CARDOSO et al., 2003). Portanto, torna-se importante a busca por novos tratamentos que possam complementar e/ou ser uma alternativa o atual tratamento para neutralização dos efeitos biológicos e toxicológicos do veneno nas vítimas de acidentes com serpentes peçonhentas. Seguindo essa linha de raciocínio, como pode ser observado no presente estudo, a complementação da soroterapia por inibidores específicos de miotoxinas pode ser viável e sua utilização terapêutica pode ser um diferencial, principalmente em relação à prevenção das sequelas causadas pelas miotoxinas (enzimas pouco imunogênicas) presentes nas peçonhas de serpentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo a purificação e caracterização bioquímica e funcional de um alfa inibidor de PLA₂s/miotoxinas (α PLI) proveniente do plasma da serpente *Bothrops alternatus*, (α BaltMIP), além da expressão heteróloga de um alfa inibidor em *Pichia pastoris* (rBaltMIP) e posterior caracterização bioquímica e funcional.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Isolar um inibidor plasmático do tipo α , a partir do plasma de *B. alternatus* (α BaltMIP);
- ✓ Caracterizar bioquimicamente este inibidor através da determinação da massa molecular relativa e sequenciamento N-terminal;
- ✓ Testar as propriedades inibitórias de α BaltMIP através da neutralização das atividades: anticoagulante, hemolítica indireta, miotóxica e citotóxica de diferentes PLA₂s e miotoxinas homólogas às PLA₂s isoladas das peçonhas das serpentes *B. jararacussu*, *B. pirajai* e *Crotalus durissus terrificus*;
- ✓ Caracterizar estruturalmente esta proteína, por meio da análise das estruturas secundárias do PLI tipo α ;
- ✓ Clonar um alfa inibidor através de técnicas de biologia molecular, sequenciar e analisar o cDNA obtido por PCR;
- ✓ Elucidar a estrutura terciária e quaternária de α BaltMIP através de técnicas de modelagem molecular;
- ✓ Realizar o estudo de *docking* molecular com α BaltMIP e BhTX-I e mapear seus prováveis sítios de interação;

- ✓ Expressar o inibidor recombinante (rBaltMIP);
- ✓ Caracterizar bioquimicamente rBaltMIP através da determinação da massa molecular relativa e sequenciamento N-terminal;
- ✓ Avaliar o potencial inibitório do rBaltMIP frente às diferentes PLA₂s e PLA₂-símile através da neutralização das atividades: hemolítica indireta, miotóxica e citotóxica;
- ✓ Analisar o potencial inibitório de rBaltMIP, através de atividade miotóxica, sem a incubação prévia com as miotoxinas testadas;

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1 Animais

O sangue da serpente *Bothrops alternatus*, foi extraído por meio de punção pela veia caudal da serpente, no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (Cevap-Unesp-Botucatu), sob a responsabilidade do Dr. Rui Seabra Ferreira Junior. O sangue foi coletado em tubos heparinizados e o plasma obtido após centrifugação foi liofilizado e armazenado a -20°C.

Para a realização da clonagem molecular de um α PLI, outro exemplar da mesma espécie foi obtido a partir do serpentário da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG. Momentos antes da coleta, a serpente foi eutanaziada com CO₂ e posteriormente foi realizada a dissecação. Amostras de fígado foram coletadas, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento da extração do RNA.

Para as atividades miotóxicas foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 18-25 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto-SP. É importante ressaltar que o projeto está de acordo com o regimento e as normas éticas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) do campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (Certificado n ° 09.1.329.53.3).

3.2 Materiais

Para a realização deste estudo foram utilizados os seguintes reagentes: Bicarbonato de amônio (AMBIC) (NH₄HCO₃) (Sigma), Fosfato de Sódio (NaH₂PO₄) (Merck), Ácido trifluoracético (TFA) (CF₃CO₂H) (Merck), Acetonitrila (ACN) (CH₃CN) (Merck), Metanol (CH₃OH) (Synth), Hidróxido de sódio (NaOH) (Synth), Acrilamida (C₃H₅NO) (Sigma Chem. Co), Bis-acrilamida (C₇H₁₀N₂O₂) (Sigma Chem. Co), N',N',N',N' – tetrametiletenodiamino (TEMED) ((CH₃)₂NCH₂CH₂N(CH₃)₂) (Sigma Chem. Co), Dodecil sulfato de sódio (SDS) (CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na) (Pharm. Biotech),

Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Chem. Co), Azul de bromofenol (Merck), β -mercaptoetanol ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$) (Pharmacia Biotech), Persulfato de amônio (PSA) ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Pharmacia Biotech), Padrões de peso molecular para proteínas de Mr 14.000-70.000 (PPM) (Sigma), Glicina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$) (Sigma Chem. Co), Tris ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$) (Invitrogen), Formiato de Amônio (NH_4HCO_2), Ácido Fórmico (CH_2O_2) (J.T. Baker), Uréia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) (J.T. Baker), Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) (J.T. Baker), Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) (J.T. Baker), Ácido clorídrico (HCl) (Synth), Ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) (Synth), Azida sódica (Sigma Chem. Co), Triton-X100 (Pharmacia Biotech), Soro fetal bovino (SFB), (Sigma Chem. Co), EDTA (Sigma Chem. Co).

3.3 Plasma humano

O plasma humano utilizado para o ensaio enzimático de coagulação “*in vitro*” foi obtido por doador voluntário, em material próprio para a coleta e armazenamento para posterior utilização no laboratório. Cabe ressaltar que o presente trabalho está de acordo com os termos da Resolução nº 196/96, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde e demais resoluções complementares à mesma e foi previamente submetido ao CEP-FCFRP.

3.4 Peçonhas

As peçonhas brutas de *Bothrops jararacussu*, *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops pirajai* foram adquiridas do Serpentário Proteínas Bioativas Ltda, Batatais-SP.

Ademais, no decorrer do texto, no item “métodos” são citados todos os equipamentos, *Kits* e *softwares* utilizados neste trabalho.

3.5 Métodos

3.5.1 Isolamento das Miotoxinas

As miotoxinas bothropstoxinas I e II (BthTX-I e II) de *B. jararacussu* foram isoladas segundo Soares e colaboradores (1998; 2000). Amostras de 200 mg de peçonha bruta foram dissolvidos em 2,5 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 50 mM, pH 8,0, centrifugado em 480xg por 10 minutos e aplicados em coluna (2,0 x 20 cm) de troca iônica em CM-Sepharose previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição da cromatografia foi realizada em um gradiente de concentração linear de AMBIC (0,05 a 0,5 M), em um fluxo de 2 mL/min. Frações de aproximadamente 2,5 mL/tubo foram coletadas por um coletor de frações Pharmacia Biotech. As absorvâncias foram monitoradas por espectrofotômetro em comprimento de onda a 280 nm e o gráfico foi traçado, utilizando-se o programa Origin 8.0, pela absorvância de cada tubo no eixo das ordenadas e o número de cada tubo lido no eixo das abscissas.

As toxinas PrTX-I e PrTX-III, foram previamente purificadas segundo Mancuso e colaboradores (1995) e Andrião-Escarso e colaboradores (2002) com modificações. Inicialmente foi realizada uma cromatografia em resina de exclusão molecular em coluna Sephadex G-75 (1,0 X 100cm). A peçonha bruta de *Bothrops pirajai* foi ressuspensa em tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05M pH 7,8 e aplicada à coluna. As frações, contendo 3,0mL/tubo, foram coletadas num fluxo de 20mL/hora. A absorvância de cada fração foi acompanhada em 280nm. Em seguida, o pico número III, foi ressuspensa em ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e submetido à cromatografia em coluna de fase reversa em HPLC utilizando uma coluna C2/C18 de 4,6x100 mm (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com o solvente A (0,1% TFA) e a amostra aplicada e eluída em um gradiente de concentração do solvente B (70% acetonitrila, 0,1% TFA) a uma concentração de 0 a 100%, em um fluxo de 1 mL/min durante aproximadamente 110 min. As frações foram monitoradas pela determinação da absorvância a 280nm.

A purificação da fração CB da crotoxina foi realizada segundo Faure e colaboradores (1994). Amostra de 500 mg da peçonha bruta de *Crotalus durissus*

terrificus foi suspensa em tampão Formiato de Amônio 0,05 M, pH 3,5 e centrifugada a 12.000xg durante 10 minutos a 0° C. Em seguida, o sobrenadante límpido foi aplicado a uma coluna contendo Sephadex G-75 (110 x 4,0 cm), previamente equilibrada, e eluído com tampão Formiato de Amônio 0,05 M, pH 3,5. Frações de 5,0 mL foram coletadas em um coletor de frações em um fluxo de 30 mL/h à temperatura ambiente. A absorbância das frações coletadas foi determinada em 280 nm. As frações obtidas foram reunidas, dializadas e liofilizadas. Para a separação das cadeias CA e CB da crotoxina, a terceira fração obtida da cromatografia de exclusão molecular foi dissolvida em 5,0 mL de tampão Tris-HCl 50 mM + Uréia 7M em pH 7,2. Posteriormente, foi realizada a incubação dessa amostra por 12 horas que, em seguida, foi concentrada em sistema de ultrafiltração Amicon (Millipore) com membrana de 10.000, para retirada da uréia. Em seguida, a amostra foi aplicada à coluna (2,0 x 24 cm) contendo DEAE-Sepharose equilibrada com o mesmo tampão. Logo após a coleta do primeiro pico, o tampão foi trocado por Tris-HCl 50 mM + 0,4 M de NaCl (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971). Após, os picos resultantes foram dialisados contra água e as frações denominadas CA e CB, foram liofilizadas e armazenadas em câmara fria para posterior utilização.

3.5.2 Isolamento do Inibidor

3.5.2.1 Confeção da coluna de Bioafinidade

Inicialmente, a proteína BthTX-I foi imobilizada em coluna de Sepharose (Pharmacia Biotech) previamente ativada com brometo de cianogênio (coluna CNBr ativada).

Para esse acoplamento da miotoxina BthTX-I, foram seguidas as especificações do fabricante. Inicialmente, a toxina BthTX-I (30 mg), previamente isolada, dessalinizada e liofilizada, foi dissolvida em tampão de ligação (NaH_2PO_4 0,1 M pH 7,5 contendo NaCl 0,1 M). Posteriormente, cerca de 300 mg da resina (previamente ativada com CNBr) foi suspensa em 10 mL de solução HCl 1mM por 15 minutos.

Em seguida, a resina foi transferida para uma coluna cromatográfica, lavada com 70 mL da mesma solução e drenada, para a inserção na coluna da solução com BthTX-I previamente preparada. A mistura Sepharose/BthTX-I foi incubada *overnight* a 4°C para o acoplamento da proteína à resina. Grupos ativos remanescentes na resina, os quais podem não terem ligado às proteínas, foram bloqueados através da incubação por duas horas da solução Sepharose/BthTX-I com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8. Para o preparo da resina, foi feita sua lavagem com 5 volumes de tampão NaH₂PO₄ 0,1 M, pH 4,0 contendo NaCl 0,5 M, seguido pelo mesmo volume do tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8 contendo NaCl 0,5 M, sendo que essa troca de tampão foi repetida posteriormente por mais 2 vezes.

3.5.2.2 Cromatografia em resina de bioafinidade BthTX-I-Sepharose

O plasma da serpente *Bothrops alternatus* previamente obtido (item 3.1), foi diluído 5x em fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e aplicado à coluna BthTX-I-Sepharose, previamente equilibrada com um volume de 10x do mesmo tampão. Após a eluição em tampão fosfato (tampão 01), as proteínas que não ficaram aderidas à coluna (*Flowthrough*) foram coletadas e monitoradas. Logo em seguida, o material ligado, contendo o inibidor de PLA₂, foi eluído com tampão glicina/HCl 0,1 M, pH 2,8, sendo que, o pH da fração coletada foi neutralizado imediatamente adicionando-se 2,0 mL de tampão Tris/HCl 0,5 M pH 8,0. As amostras foram coletadas por um coletor de frações Pharmacia Biotech em um volume de aproximadamente 2,0 mL/tubo. As absorbâncias foram monitoradas por espectrofotômetro em comprimento de onda a 280 nm. Posteriormente, o material obtido foi dessalinizado e concentrado utilizando-se o sistema de ultra-filtração Amicon em membrana YM-3.000 com sucessivas lavagens em bicarbonato de amônio 0,05 M pH 8,0, aliquotados em tubos de 1,0 mL, liofilizados e armazenados para posterior utilização.

3.5.2.3 Cromatografia em sistema HPLC em coluna de fase reversa

Com o intuito de analisar o grau de pureza da proteína isolada, foi realizada uma cromatografia líquida em sistema de alta pressão (HPLC) em coluna de fase

reversa (C2/C18, 4,6 × 100 mm) (GE Healthcare), a qual foi previamente equilibrada com o solvente A [ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%], e eluída com um gradiente de concentração de solvente B [acetonitrila (ACN) 70%, TFA 0,1%] de 0 a 100%, em um fluxo de 1 mL/min durante 110 minutos. Os picos foram monitorados pela determinação da absorbância a 280 nm e coletados por coletor de frações do próprio sistema (*Akta Purifier, GE healthcare*).

3.5.3 Determinação quantitativa de proteínas

Para quantificar proteínas presentes nas amostras utilizadas, soluções contendo de 0,1 a 2,0 mg de proteínas foram submetidas à dosagem pelo método do microbiureto, conforme descrito por Itzhaki e Gill (1964). A curva padrão foi construída utilizando-se soroalbumina bovina em diferentes concentrações.

3.5.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida e Determinação do Peso Molecular

A determinação do peso molecular foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970), com modificações conforme descrito a seguir. O gel de resolução a 12% (m/v) em acrilamida (bis-acrilamida: acrilamida 1:19 m/m) foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 8,8 e SDS 10%. O gel de concentração a 6% em acrilamida foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 10%. Amostras de proteína foram dissolvidas em salina tamponada em fosfato (PBS), acrescidas de 4 µL de tampão para amostras, Tris-HCl 0,5 M, pH 6,5 contendo azul de bromofenol (0,01%), SDS (2%) e glicerol (10%), e submetidas a fervura a 100°C, por 4 minutos. 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%.

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado por 10 minutos 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 10%, sendo, em seguida, documentado em scanner.

As proteínas utilizadas como padrões de pesos moleculares e suas respectivas massas moleculares relativas foram: α -Lactalbumina (14.400); Inibidor de tripsina (20.100); Anidrase carbônica (30.000); Ovalbumina (45.000); Soroalbumina bovina (66.000) e Fosforilase b (97.000). A mobilidade eletroforética relativa de cada banda foi determinada em centímetros e a massa molecular foi calculada, relacionando-se a mobilidade eletroforética relativa com o logaritmo das massas moleculares do padrão.

3.5.5 Sequenciamento N-terminal

As análises das sequências N-terminais dos inibidores nativo e recombinante de *B. alternatus* foram realizadas por degradação de Edman em um sequenciador automático de proteínas PPSQ-33A (Shimadzu). Os inibidores foram dissolvidos em tampão Tris-HCl 0,4 M pH 8,1 contendo 6 M de hidrocloreto de guanidina, reduzidos com ditioneitol (DTT) e carboximetilados com ácido iodoacético. As análises das composições em aminoácidos foram realizadas pela derivatização com fenilisotiocianato e aminoácidos padrões-PTH separados em coluna de fase reversa em HPLC. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências de aminoácidos de outras proteínas relacionadas na base de dados SWISS-PROT/TREMBL usando o programa BLAST FASTA. Os sequenciamentos dos resíduos de aminoácidos a partir da região N-terminal das proteínas nativa e recombinante foram realizadas no laboratório da Profª Drª Eliane Candiane Arantes Braga, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, na Universidade de São Paulo.

3.5.6 Espectroscopia de dicroísmo circular

Medições de dicroísmo circular (DC) foram realizadas em um modelo JASCO J espectropolarímetro CD-810 equipados com um peltier termo-controlador dentro de uma faixa espectral de 190-260nm. Os experimentos foram realizados a 20 °C

utilizando um caminho óptico de 1 mm com uma velocidade de digitalização de 20 nm/min e tempo de resposta de 2 segundos. Vinte espectros foram acumulados, medidos e corrigidos a partir da linha de base da solução tampão e os espectros resultantes foram normalizados a elipticidade residual molar $[\theta]$. Amostras (proteína individualmente e complexos) foram analisadas em tampão fosfato 5mM, pH 7,4, na concentração de 10 μ M.

Os complexos enzima/inibidor foram preparados pela mistura destes na razão molar 1:1, seguido de incubação por 2 horas a 4 °C. Todas as soluções antes da experimentação foram centrifugadas a 20.000 $\times g$ por 10 minutos para remover quaisquer agregados e partículas insolúveis. A análise dos dados de deconvolução foi conduzida utilizando algoritmos implementados no servidor Dychroweb (WHITMORE; WALLACE, 2008).

As análises de dicroísmo circular da proteína nativa foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Mário Tyago Murakami, laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais de Campinas, enquanto que as análises de dicroísmo circular da proteína recombinante foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Marcos Fontes, no laboratório de Biologia Molecular Estrutural, do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu.

3.5.7 Espalhamento dinâmico de luz

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi realizado com α BaltMIP a 4°C (277 K) e a 10°C (283 K), na concentração de 1,0 mg/mL usando um equipamento DynaPro TITAN (Wyatt Technology). Os resultados foram analisados com o software v.6.10 Dynamics. Os dados foram medidos cem vezes em triplicata. Os experimentos de DLS foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Marcos Fontes, laboratório de Biologia Molecular Estrutural, do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu.

3.5.8 Neutralização da atividade fosfolipásica

A habilidade de α BaltMIP e rBaltMIP em inibir a atividade enzimática de Asp49 PLA₂s (BthTX-II, BthA-I-PLA₂, PrTX-III e CB) foi avaliada pelo método de hemólise radial indireta, realizado em placas como descrito por Gutiérrez e colaboradores (1988) trocando agarose por ágar. O experimento consiste na elaboração de um gel em um volume final de aproximadamente 30 mL contendo CaCl₂ 0,01M; gema de ovo diluída em PBS (pH 7,2) na proporção 1:3 (v/v); eritrócitos diluídos em PBS (pH 7,2) também na proporção 1:3 (v/v); ágar bacteriológico 1% e azida de sódio 0,005%. Após o gel se solidificar foram feitos orifícios de tamanho uniforme (aproximadamente 0,5 cm de diâmetro) e aplicaram-se as amostras de PLA₂s ou PLA₂s previamente incubadas por 1h a 37 °C, com o inibidor, a um volume final de 40 μ L.

Os géis contendo as amostras foram incubados em estufa a 37 °C por 12 horas. A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel foi considerada como indicativo de atividade fosfolipásica e os halos foram medidos para a quantificação desta atividade. A atividade das PLA₂s sozinhas foram consideradas como 100% de atividade.

3.5.9 Neutralização da atividade Anticoagulante

A atividade anticoagulante foi realizada de acordo com método previamente descrito por Alvarado e Gutiérrez (1988), utilizando plasma humano citratado. Para o ensaio, o plasma foi descongelado e mantido incubado a 37 °C. O inibidor (α BaltMIP) foi avaliado quanto à capacidade de inibição desta atividade através de prévia incubação com Asp49 PLA₂s (BthTX-II, BthA-I-PLA₂, PrTX-III e CB) em diferentes razões molares. As Amostras previamente incubadas foram adicionadas a 200 μ L de plasma citratado por 1 a 10 min a 37°C sendo posteriormente adicionados 25 μ L de solução de cloreto de cálcio (0,25 mM), cronometrando-se o tempo de coagulação em minutos.

3.5.10 Neutralização da Miotoxicidade

A atividade miotóxica foi realizada pela medida dos níveis de creatina cinase (CK) no plasma de camundongos. Em grupos de 5 camundongos machos Swiss (18-22g) foram injetados no músculo gastrocnêmio 50 μ L de PBS sozinho ou contendo 50 μ g das miotoxinas Asp49 e Lys49 (BthTX-I e II de *B. jararacussu*, PrTX-I e III de *B. pirajai*) isoladamente ou previamente incubadas com α BaltMIP/rBaltMIP. Para análise da inibição sem incubação prévia das miotoxinas (ou peçonha bruta) com rBaltMIP, foram realizadas injeções no tempo 0h de PBS, Miotoxina ou peçonha bruta e passados 30 minutos injetando-se PBS ou rBaltMIP. Após três horas, o sangue dos camundongos foi coletado, por corte na extremidade da cauda, em capilares heparinizados e imediatamente centrifugados a 3.000 xg por 10 minutos.

A atividade da enzima creatina cinase foi determinada utilizando-se 4 μ L de plasma com 1,0 mL de reagente do *Kit* cinético CK-UV K010 (Bioclin), dissolvido em água destilada a 37 °C e realizando-se a leitura a 340 nm, após 3 minutos. 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.

3.5.11 Análise histopatológica das fibras musculares

Após a coleta do sangue para a avaliação 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.

3.5.12 Neutralização da Citotoxicidade

Com o intuito de medir a atividade citotóxica em linhagens de células de mioblastos de camundongos (C2C12), foi realizado o método de MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MOSMANN, 1983), que avalia a concentração de células viáveis após incubação com elemento citotóxico.

As células foram cultivadas em frascos apropriados (garrafas para cultura celular) e a concentração (contagem) de células foi determinada em câmara de Neubauer. Após a contagem, as células foram colocadas em microplacas de cultura de 96 poços para que cada poço contivesse 1×10^5 células. Depois de 24 horas de cultivo, o meio foi removido e, diferentes concentrações das amostras foram adicionadas e incubadas por 24h (BthTX-I, BthTX-II, PrTX-I, PrTX-II, pepBthTX-I, α BaltMIP, rBaltMIP). Após este período, 20 μ L de MTT a 10 mg/mL foram adicionados aos poços e incubados por mais 3 horas para que as células viáveis incorporassem o tetrazolium. Em seguida, as células foram submetidas à rotação em centrífuga para microplaca (Eppendorf) a 3000 xg durante 5 minutos. Finalmente, 10 μ L de DMSO foram adicionados em cada poço, no intuito de dissolver os cristais de formazan formados no meio de cultura.

Em seguida, foram feitas as leituras das placas em espectrofotômetro de microplacas no comprimento de onda de 570 nm. A taxa de viabilidade celular foi calculada pelo programa *GraphPad Prism 5* levando-se em conta o controle negativo (PBS) como 100% de viabilidade.

3.5.13 Extração de RNA e síntese do DNA

Aproximadamente 120 mg de fígado congelado de *B. alternatus* foram congelados e posteriormente triturados a um pó fino com um pilão na presença de nitrogênio líquido e utilizados para o isolamento do RNA total, seguindo o método de tiocianato de guanidina - Trizol® (Invitrogen, EUA). A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1%. A eletroforese foi executada em 100 V/cm usando tampão TBE (89 mM Tris base, 89 mM de ácido bórico, EDTA 2 mM, pH 8,0) como eletrólito de corrida. O gel foi examinado sob luz UV, na presença

de brometo de etídio, para a presença das bandas 18S e 28S correspondentes ao RNA ribossomal. O cDNA foi sintetizado a partir de 2 a 5 mg de RNA total usando um *kit* de síntese de cDNA com oligo (dT) primer 18/12, na presença de DTT (*First-Strand kit* de síntese, Invitrogen, EUA).

As reações de PCR foram realizadas com oligonucleotídeos específicos concebidos com base na codificação de nucleotídeos de sequência para os α PLIs de *T. flavoviridis* (NOBUHISA et al., 1997). As condições de amplificação foram: 5 min a 94°C, 35 ciclos de 3 minutos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C, seguido por um período de extensão de 7 min a 72°C (Perkin Elmer 2400 Termociclador). Um controle negativo foi realizado sem DNA. Alíquotas da reação de amplificação foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE, na presença de brometo de etídio.

3.5.14 Clonagem de cDNA e sequenciamento de α BaltMIP

Os produtos da PCR foram clonados em plasmídeo TA pCR 2.1 de acordo com as instruções do fabricante (*TA Cloning Kit*, Invitrogen, EUA). Após a transformação de células competentes de *Escherichia coli* INV α F', possíveis colônias positivas foram confirmadas por PCR com *primers* específicos para α PLIs (NOBUHISA et al., 1997). Os clones positivos foram selecionados aleatoriamente para o crescimento em meio líquido e o DNA recombinante foi purificado usando um *kit* comercial (*Wizard Plus Minipreps*, Promega, EUA).

Os DNAs foram completamente sequenciados pelo método de cadeia de terminação dideoxy (SANGER et al., 1977) em um sistema automatizado *ABI Prism 310 Genetic Analyser* (Perkin Elmer Applied Biosystems, EUA), usando oligonucleotídeos M13 *forward* e M13 *reverse* como *primers* utilizando-se o *ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle* (Perkin Elmer Applied Biosystems, CA, EUA). As sequências completas de cDNA foram depositadas no GenBank NCBI (EU421901 até EU421905). A extração do RNA total e a clonagem dos inibidores foram realizadas na Fundação Ezequiel Diaz (FUNED) em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Consuelo Fortes Dias e a Dr^a Maria Inácia Estevão da Costa.

3.5.15 Seleção e alinhamento das sequências homólogas

As sequências homólogas ao inibidor α BaltMIP foram obtidas a partir do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o algoritmo *protein blast* e *BLOSUM45 matrix*. O alinhamento múltiplo entre a sequência do α BaltMIP e as sequências homólogas selecionadas foram realizadas pelo programa AMAP v.2.2 usando parâmetros *default* (SCHWARTZ; PACHTER, 2007).

3.5.16 Modelagem molecular da proteína

O modelo cristalográfico de proteína pulmonar surfactante D (SP-D) de *Homo sapiens* (código PDB 2RIC) foi escolhido como o melhor modelo para a construção do modelo estrutural teórico para α BaltMIP. Para a confecção do modelo estrutural teórico de α BaltMIP foram gerados diferentes estruturas terciárias por diversos programas, sendo eles: três modelos pelo programa *MODELLER* (MARTI-RENO et al., 2000) (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/MODELLER>), um modelo pelo programa *Swissmodel* (<http://swissmodel.expasy.org/>) e um outro modelo pelo programa do MHOLL (<http://www.mholline.lncc.br/>).

3.5.17 Avaliação do melhor modelo estrutural

As análises dos modelos obtidos foram realizadas através de três metodologias diferentes, utilizando-se inicialmente o programa PROCHECK (http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools_structureassessment 1) e os programas VERIFY 3D (Bowie et al., 1991; Luethy et al., 1992) (http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/) e WHAT IF (Vriend; Sande, 1993) (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>). Todas as figuras resultantes desses estudos foram confeccionadas pelo programa PYMOL v1.5.0.

3.5.18 Simulações de dinâmica molecular

A simulação de dinâmica molecular (DM) foi executada pelo programa GROMACS (Máquina Groningen para Simulação Química) v.4.0.2 (BERENDSEN et al., 1995, LINDAHL et al., 2001) na presença de moléculas de água (BERENDSEN et al., 1981), usando um processador Intel Core 2 Quad x64 equipado com um sistema operacional Ubuntu Linux v.10.04.

Os estados de protonação dos grupos carregados foram definidos em pH 7,0. Contra-íons foram adicionados ao sistema para a neutralização e o *GROMOS96 53a6 force field* (OOSTENBRINK et al., 2005) foi escolhido para realizar a simulação DM. Uma energia de minimização (EM) usando um algoritmo de gradiente foi utilizada para gerar a configuração inicial do sistema. Após esta etapa, 200 ps de simulação DM, com PRMD foi executado, a fim de reestabelecer o sistema suavemente. Então, 10 ns de simulação MD contínuos foram calculados para avaliar a estabilidade das estruturas. Todas as simulações de DM foram realizadas em temperatura (298 K) e pressão (1,0 bar) constantes.

3.5.19 Avaliação do modelo estrutural teórico de α BaltMIP e montagem da estrutura hipotética oligomérica

Com o intuito de se avaliar a qualidade geral de todos os modelos teóricos para α BaltMIP obtidos após a modelagem e simulação MD, estes, foram checados com os programas RAMPAGE (LOVELL et al., 2003) e ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) (Wiederstein and M.J. Sippl). Os valores médios de RMSF dos átomos do monômero final de α BaltMIP, proveniente do modelo MD foram calculados e convertidos em valores *B-factor* usando o programa GROMACS v.4.0.2 (BERENDSEN et al., 1995, LINDAHL et al., 2001). Os raios de rotação apresentados pelo modelo de α BaltMIP durante a simulação MD também foram calculados com o programa GROMACS v.4.0.2. A montagem da estrutura teórica do trímero de α BaltMIP foi realizada pelo programa O v.11.0.5 (JONES et al., 1990) por meio de alinhamentos de átomos de C α entre o modelo final MD de α BaltMIP e cada um dos monômeros do SP-D.

Um anelamento simulado utilizando o programa CNS v.1.2 (BRÜNGER et al., 1998) foi também realizado a fim de verificar a viabilidade do trímero α BaltMIP teórico montado com o programa O v.11.0.5. Os estudos de modelagem e simulação *in silico* (itens 3.3.16 - 3.3.20 foram realizados em colaboração com os Profs Drs Carlos Tomich (FCFRP-USP) e Marcos Fontes (UNESP) e com o Dr Ângelo Magro (UNESP).

3.5.20 Análise de docking molecular e mapeamento da possível região de interação rBaltMIP/Lys49 PLA₂s-símile.

Os programas utilizados para a realização dos *docking* macromoleculares foram o AutoDockTools 1.5.4 (ADT) (<http://autodock.scripps.edu/>) e o ZDOCK 3.0.2 (<http://zdock.umassmed.edu/>). Usando o ADT, foram retiradas as águas de hidratação e ligantes presentes nas estruturas de rBaltMIP, BthTX-I na estrutura dimérica alternativa (PDB ID 3CYL) (DOS SANTOS et al., 2009; LOMONTE; RANGEL., 2012) e BthTX-I em sua estrutura dimérica convencional (PDB ID 1CLP) (ARNI et al., 1995; DOS SANTOS et al., 2009; LOMONTE; RANGEL., 2012).

Primeiramente, utilizando-se o programa ZDOCK, foi realizado docking cego, onde as proteínas não tinham nenhuma marcação de possíveis regiões de interação. Posteriormente, para avaliar mais profundamente a interação das Lys49 PLA₂s-símile diretamente com rBaltMIP, foi realizado docking fino, limitando-se à região de ligação das proteínas que teriam interação. É importante ressaltar que somente os sítios miotóxicos das Lys49 PLA₂s-símile foram considerados para o estudo de docking macromolecular e que os estudos dos possíveis sítios miotóxicos foram baseados nos artigos de revisão de Dos Santos e colaboradores (2009) e mais profundamente Lomonte e Rangel (2012). Todas as figuras resultantes desses estudos foram confeccionadas pelo programa PYMOL v1.5.0. Os estudos de docking molecular foram realizados em colaboração com o Prof Dr Carlos Tomich (FCFRP-USP).

3.5.21 Expressão do *rBaltMIP* em *Pichia pastoris*

3.5.21.1 Construção do vetor de expressão

Para a amplificação dos genes que codificam o α BaltMIP, foram utilizados 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 são:

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 posteriormente aplicados em gel de agarose 1%, do qual as bandas de interesse foram eluídas utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). A ligação do gene de α BaltMIP ao vetor foi realizada por meio de reação com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) por 5 h a 22°C. O plasmídeo recombinante foi utilizado na transformação por choque térmico de células de *Escherichia coli* DH5 α , CaCl₂ competentes. Após crescimento 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. Os plasmídeos amplificados foram então purificados por lise alcalina pela técnica de mini-preparação (*miniprep*) (BIRNBOIM; DOLY, 1979) e a presença e orientação dos insertos foram confirmadas por sequenciamento automático utilizando o kit *ET Dye Terminator* e o equipamento *MEGA-BACE 1000 automated DNA sequencer* (GE Healthcare).

3.5.21.2 Transformação de células de *Pichia pastoris* e seleção de colônias recombinantes

Para a transformação da levedura *P. pastoris*, o plasmídeo pPICZ α A - α BaltMIP foi linearizado com a enzima de restrição *Pme*I (New England Biolabs). Em

seguida, o plasmídeo linearizado foi utilizado para transformar células de *P. pastoris* da linhagem KM71H eletrocompetentes, previamente incubadas com DTT para aumentar a eficiência da transformação, e lavadas e ressuspensas em sorbitol 1 M (Cregg, 2007). Três a cinco microgramas de DNA linearizado foram incubados por 5 min com 40 µL de células competentes, transferidos para cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad) e submetido à eletroporação no equipamento GenePulser II (Bio-Rad) nas seguintes condições: 1500 V, 25 µF, 200 Ω.

Após o choque, para a seleção dos transformantes, 50 e 100 µL de células foram plaqueadas em meio YPDS ágar (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%, sorbitol 1 M e Agar 2%) contendo 100 µg/mL de zeocina e incubados a 30°C por 3-5 dias. Para a seleção de colônias recombinantes contendo múltiplas cópias do gene, 200 µL de células foram plaqueadas em meio YPDS contendo 500 µg/mL de zeocina e incubadas nas condições descritas anteriormente. As colônias recombinantes foram então submetidas a PCR de colônia e o produto da reação foi visualizado em gel de agarose 1% para a confirmação da incorporação do inserto no DNA genômico da levedura.

3.5.21.3 Triagem em placa da expressão de proteína recombinante

As condições de expressão da proteína recombinante foram avaliadas conforme descrito no manual *Easy Select Pichia Expression* (Invitrogen). As colônias foram individualmente inoculadas em placa *deep well* de 24 poços contendo 3 mL de meio BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, YNB 1,34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$, glicerol 1%, fosfato de potássio 100 mM) por poço e incubadas a 30°C sob agitação. Após 48 h, as culturas foram centrifugadas a 3000 xg, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de meio BMMY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, YNB 1,34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$, metanol 1%, fosfato de potássio 100 mM) para a indução da expressão, e então as culturas foram incubadas novamente nas mesmas condições descritas anteriormente.

Para a manutenção da indução, foi realizada reposição de metanol 100% em uma concentração final de 0,75% a cada 24 h. Alíquotas da indução foram coletadas nos tempos de 72 e 144 h e centrifugadas a velocidade máxima. Os sobrenadantes

foram então analisados em gel SDS-PAGE 12% (item 3.5.4) corado com *Comassie Brilliant Blue* para determinação dos níveis de expressão. Todos os experimentos realizados para a expressão e purificação do inibidor recombinante (item 3.3.21) foram realizados no Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) sob a supervisão do Prof Dr Flávio Henrique Silva e em colaboração com a Dr^a Ludier Kesser Santos Silva e a Msc Johara Boldrini-França.

3.5.22 Análise estatística 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*.

4. RESULTADOS

4.1 Obtenção das Fosfolipases A₂ das peçonhas de *Bothrops jararacussu*, *Bothrops pirajai* e *Crotalus durissus terrificus*

Diferentes PLA₂s Asp49 e PLA₂s-símile Lys49 foram selecionadas para os ensaios de neutralização das atividades das respectivas enzimas quando incubadas com o inibidor α BaltMIP.

As enzimas Asp49 BthTX-II, BthA-I-PLA₂, PrTX-III e CB foram utilizadas para o ensaio de neutralização das atividades fosfolipásicas e anticoagulantes. Já as toxinas BthTX-I, PrTX-I, BthTX-II e PrTX-III foram utilizadas para testar as propriedades inibitórias de α BaltMIP e rBaltMIP frente às atividades miotóxicas e citotóxicas.

Para a purificação das toxinas BthTX-I e BthTX-II, os fracionamentos da peçonha da espécie *Bothrops jararacussu* foram realizados em cromatografia de troca iônica, em resina de CM-Sepharose pH 8,0 (Item 3.5.1). Desse fracionamento, foram obtidos seis diferentes picos, sendo que o pico P5 é considerada a enzima BthTX-II e o pico P6 a miotoxina BthTX-I (Fig. 1A).

Para purificação das toxinas PrTX-I e PrTX-III, foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-75 da peçonha bruta de *Bothrops pirajai* (Fig. 1B). Essa cromatografia rendeu cinco picos principais (P1-P5). O pico P3, foi então submetido ao HPLC para a separação da PrTX-I, PrTX-II e PrTX-III (Fig. 1C).

Para a purificação do componente básico da crotoxina (CB), a peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G-75 rendendo 5 picos principais (Fig. 1D). O pico IV(P4), que é a crotoxina foi então reunido, liofilizado e submetido ao tratamento para a separação dos componentes ácido (CA) e básico (CB). Para a separação das cadeias CA e CB da crotoxina, a quarta fração obtida da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 foi dissolvida em tampão contendo uréia para a desnaturação da amostra. Em seguida, a amostra foi recromatografada em coluna contendo DEAE-Sepharose para a separação das cadeias, a qual resultou nas frações denominadas CA e CB (Fig. 1E).

A Figura 1F mostra o SDS-PAGE das PLA₂s isoladas com excelente grau de pureza apresentando massa molecular ao redor de 14.000, na presença de agente redutor.

Figura 1: Purificação das PLA₂s Asp49 e PLA₂s-símile Lys49. **(A)** Cromatografia de troca iônica em resina CM-Sepharose. 200 mg da peçonha de *B. jararacussu* foram aplicados à coluna e a eluição foi feita com gradiente de concentração de tampão bicarbonato de amônio (0,05-0,5 M). **(B)** Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-75, da peçonha bruta de *Bothrops pirajai* (200 mg). **(C)** Cromatografia em coluna de fase reversa em HPLC utilizando uma coluna C2/C18 para a purificação das proteínas PrTX-I, PrTX-II e PrTX-III. **(D)** Purificação da proteína básica (CB) do complexo crotoxina. A peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* (200 mg) foi aplicada em coluna Sephadex G-75, rendendo cinco picos principais. **(E)** Para a separação das cadeias CA e CB da crotoxina, a terceira fração obtida da cromatografia de exclusão molecular foi aplicada em coluna DEAE-Sepharose. **(F)** SDS-PAGE a 12%: 1- PrTX-I (10 µg); 2- PrTX-II (10 µg); 3- PrTX-III (10 µg); 4- BmooTX-I (10 µg); 5- PPM; 6- BthTX-II (10 µg); 7- BthTX-I (10 µg); 8- CB (10 µg); As proteínas do padrão e suas respectivas massas moleculares relativas são (de baixo para cima): α-Lactalbumina 14.400; Inibidor de tripsina 20.100; Anidrase carbônica 30.000; Ovalbumina 45.000; Soralbumina bovina 66.000 e Fosforilase b 97.000.

4.2 Isolamento do inibidor de fosfolipases A₂ do tipo alfa (α BaltMIP) do plasma da serpente *Bothrops alternatus* e caracterização bioquímica parcial

Para a purificação do inibidor de miotoxinas α BaltMIP a partir do plasma da serpente *Bothrops alternatus*, foi utilizado o método de cromatografia por bioafinidade. Essa técnica é uma cromatografia por isolamento seletivo de macromoléculas biológicas, através da união reversível de uma substância de interesse, à fase estacionária composta por um ligante específico. No caso da purificação de α BaltMIP, a fase estacionária é a resina Sepharose-BthTX-I. Inicialmente, para a confecção da coluna de bioafinidade para inibidores de miotoxinas, a proteína BthTX-I foi imobilizada em coluna de Sepharose (Pharmacia Biotech) previamente ativada com brometo de cianogênio (coluna CNBr ativada), como observado no item 3.5.2. Posteriormente, o plasma da serpente *Bothrops alternatus* foi diluído e aplicado à coluna BthTX-I-Sepharose. A cromatografia por bioafinidade do plasma da serpente *Bothrops alternatus* resultou em dois picos principais (Fig. 2A), sendo que o segundo pico, eluído após a diminuição do pH de eluição, foi considerado como o provável inibidor de miotoxinas, α BaltMIP.

O grau de pureza do inibidor foi verificado em HPLC utilizando coluna de fase reversa C2/C18, com gradiente linear de concentração do tampão B (Acetonitrila 70%, TFA 0,1%) de 0 a 100% (Fig. 2B). A amostra resultante, denominada α BaltMIP, apresentou elevado grau de pureza em SDS-PAGE, com massa molar relativa de 24.000 (Fig. 2A).

Após a purificação, a análise da sequência N-terminal da proteína foi realizada por sequenciamento direto, por meio da degradação de Edman, e os resíduos de aminoácidos separados em coluna de fase reversa em sistema HPLC foram comparados com os padrões PTH do sistema. Neste procedimento, foram sequenciados os primeiros 31 resíduos de aminoácidos a partir do N-terminal da proteína nativa, apresentando a sequência de aminoácidos HEQDPDGKLLNSLIDALMHLQREFAKLRGAF.

Com base nesta sequência de aminoácidos obtida, foi realizada a busca por proteínas homólogas, para a comparação e classificação da proteína. Para tanto, foi inicialmente realizada uma busca por proteínas homólogas utilizando-se o programa

Blast, no banco de dados *Protein* do sítio da *US National Library Medicine National* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A proteína purificada mostrou alta homologia sequencial com α PLIs purificados a partir de plasma de serpentes, sendo então classificada como tal. Para o alinhamento múltiplo das sequências dos resíduos de aminoácidos a partir do N-terminal de α PLIs, foi utilizado o programa ClustaX2. O inibidor α BaltMIP foi alinhado com diferentes sequências de α PLIs, os quais apresentaram maior homologia de estrutura primária (Fig. 3).

Figura 2: (A) Purificação do inibidor de fosfolipase A_2 tipo α realizada em cromatografia de afinidade em Sepharose ativada com CNBr. O plasma de *B. alternatus* (~10 mL) foi diluído em 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2 (tampão 1) e aplicado à coluna num fluxo de 2,0 mL/min. O inibidor foi eluído com glicina-HCl 0,1 M, pH 2,8 (tampão 2). (B) Avaliação do grau de pureza do α BaltMIP em HPLC em coluna C2/C18, eluída com um gradiente de concentração de 0-100% de solvente B (acetonitrila 70%, TFA 0,1%); SDS PAGE 12% em condições desnaturantes do inibidor purificado. Em 1: padrão de peso molecular: α -Lactalbumina 14,4; Inibidor de tripsina 20.100; Anidrase carbônica 30.000; Ovalbumina 45.000; Soralbumina bovina 66.000 e Fosforilase b 97.000; em 2: α BaltMIP (~20 μ g).

<i>Bothrops alternatus</i>	HEQDPDGKLLNSLIDALMHLQREFAKLRGAF
<i>Bothrops erythromelas</i>	HEQDPDGKVLNSLIDALMHLQREFAKLRGAF
<i>Bothrops neuwiedi</i>	HEQDPDGKVLNSLIDALMDLQREFAKLRGAF
<i>Bothrops jararaca</i>	HEQDPDGKVLNSLIDALMHLQREFANLRGAF
<i>Bothrops jararacussu</i>	HEEDPDGKVLNSLIDALMHLQREFANLKGSF
<i>Bothrops moojeni</i>	HEEDPDGKVLNSLIDSLMHLQREFANLKDAF
<i>Agkistrodon blomhoffii siniticus</i>	HETDPDGHVLNSLMLIVMRLQREFSNLKDGF
<i>Lachesis muta muta</i>	HDTPDQGMLNSVIESVMILQREFANLKHAF
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	HETDPDGQVMSSMIETLMFLQKEYANLRYAF
	*: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *

Figura 3: Comparação da sequência de aminoácidos da região N-terminal de α BaltMIP com outros PLIs de serpentes usando base de dados SwissProt e o programa CLUSTAL. α PLIs: *Bothrops alternatus* (gi: 215275473); *Bothrops erythromelas* (gi: 215275474); *Bothrops neuwiedi* (gi: 218546740); *Bothrops jararaca* (gi: 215275475); *Bothrops jararacussu* (gi: 167547115); *Bothrops moojeni* (gi: 218546738); *Agkistrodon blomhoffii siniticus* (gi: 6467183); *Lachesis muta muta* (gi: 218546736); *Trimeresurus flavoviridis* (gi: 160357989).

Com o intuito de se estudar a estrutura secundária do α BaltMIP e sua interação com PLA₂s foi realizada a espectroscopia por dicroísmo circular de miotoxinas Lys49 (BthTX-I) e Asp49 (BthTX-II e CB), do inibidor α BaltMIP e de seus respectivos complexos.

Todas as PLA₂s (Asp49) e PLA₂-símile (Lys49) estudadas mostraram curvas características das proteínas helicoidais apresentando picos bem definidos em comprimentos de onda entre 208 e 222 nm como esperado para uma estrutura de PLA₂ proveniente de peçonha de serpente (Fig. 4A).

Analogamente, o espectro de dicroísmo circular (DC) do inibidor indica um alto teor de elementos de estrutura helicoidal em sua estrutura (Fig. 4A). Espectros de DC dos complexos PLA₂/inibidor são consideravelmente diferentes daqueles correspondentes às proteínas individuais (Fig. 4B, para mais detalhes, ver Fig. 4C).

Dados de deconvolução sugerem que os complexos obtiveram um ganho relativo de elementos de estrutura helicoidal em relação às proteínas individuais (Tabela 1), o que pode indicar uma estrutura mais compacta durante a formação do complexo.

Figura 4: Espectro de dicroísmo circular (DC) em *Far UV* para αBaltMIP, PLA₂s e a associação entre αBaltMIP/PLA₂s. **(A)** Espectros para CB, BthTX-I, BthTX-II e αBaltMIP e os respectivos complexos dessas enzimas com αBaltMIP **(B)**; para um maior detalhamento o gráfico **(C)** apresenta somente o complexo BthTX-I e αBaltMIP. Todos os complexos estão na proporção molar de 1:1.

Tabela 1. Dados de deconvolução das proteínas PLA₂ CB, BthTX-I, BthTX-II e seus complexos com α BaltMIP, usando o método CDSSTR.

	α -hélice	Folhas β	Turn	<i>randon coil</i>	Total
CB	0,39	0,14	0,19	0,27	0,99
BthTX-I	0,44	0,17	0,13	0,16	1,00
BthTX-II	0,54	0,12	0,14	0,20	1,00
αBaltMIP	0,50	0,13	0,16	0,22	1,01
Complexo1	0,48	0,13	0,16	0,24	1,01
Complexo2	0,60	0,15	0,11	0,14	1,00
Complexo3	0,55	0,11	0,14	0,20	1,00

Onde: complexo 1 é referente ao complexo CB / α BaltMIP, complexo 2: referente ao complexo BthTX-I / α BaltMIP e complexo 3: referente ao complexo BthTX-II / α BaltMIP.

4.3 Atividades de neutralização das PLA₂s Asp49 e PLA₂s-símile Lys49

Depois de purificado e classificado como um α PLI, o α BaltMIP foi testado para avaliar sua capacidade inibitória contra diferentes toxinas. Inicialmente, avaliada sua capacidade em inibir a atividade fosfolipásica, de diferentes enzimas PLA₂s Asp49 (BthTX-II, PrTX-III, BthA-I-PLA₂ e CB), através do método de hemólise indireta (item 3.5.8).

Por esta atividade, foi possível observar uma discreta redução na atividade fosfolipásica das Asp49 PLA₂s, principalmente na maior proporção molar (1:1; PLA₂/PLI), apresentando valores inibitórios máximos de aproximadamente 40%, para as enzimas BthTX-II e PrTX-III. Além disso, o α BaltMIP não demonstrou inibição importante da atividade fosfolipásica da PLA₂ CB de *C. d. terrificus* (Fig. 5).

Figura 5: Caracterização das propriedades inibitórias de αBaltMIP frente à atividade fosfolipásica de diferentes PLA₂s Asp49. BthTX-II (**A**), BthA-I-PLA₂ (**B**), PrTX-III (**C**) e CB (**D**). As enzimas foram previamente incubadas com o inibidor em diferentes razões molares PLA₂/PLI (mol/mol) 1:0,2; 1:0,6; 1:1. A atividade total de cada PLA₂ foi considerada como 100% de atividade. O inibidor αBaltMIP foi incubado sozinho para testar se possuía atividade fosfolipásica, o que não ocorreu. Resultados expressos como a média ± SD (n=3) e os resultados estatisticamente significantes (p<0,05) foram indicados pelo asterisco (*).

Em seguida, foi avaliada a capacidade inibitória do α BaltMIP contra as propriedades anticoagulantes de diferentes enzimas. Essa atividade foi avaliada quanto à capacidade de inibição desta atividade através de incubação prévia do inibidor com PLA₂s Asp49 (BthTX-II, BthA-I-PLA₂, PrTX-III e CB) em diferentes razões molares (PLA₂/ α BaltMIP).

Assim como no teste de inibição da atividade catalítica das Asp49 PLA₂s, foi possível observar uma discreta redução na atividade anticoagulante das PLA₂s, principalmente na maior proporção molar (1:1; PLA₂/PLI) para as enzimas BthTX-II e PrTX-III. Além disso, assim como o ocorrido no teste de inibição da atividade fosfolipásica, o inibidor α BaltMIP não demonstrou inibição importante da atividade anticoagulante da PLA₂ CB de *C. d. terrificus* e BthA-I-PLA₂ de *Bothrops jararacussu* (Fig. 6).

Figura 6: Atividade de inibição das atividades anticoagulantes das PLA₂s Asp49 BthTX-II (A), BthA-I-PLA₂ (B), PrTX-III (C) e CB (D). As enzimas foram previamente incubadas com o inibidor em diferentes razões molares PLA₂/PLI (mol/mol) 1:0,2; 1:0,6; 1:1. A atividade total de cada PLA₂ foi considerada como 100% de atividade. O inibidor α BaltMIP foi incubado sozinho para testar sua atividade anticoagulante, a qual foi igual a 0. Resultados expressos como a média $\pm$ SD (n=3) e os resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram indicados pelo asterisco (*).

Posteriormente, foram avaliadas as propriedades inibitórias do α BaltMIP frente às diferentes toxinas Asp49 PLA₂s (BthTX-II, PrTX-III), e Lys49 PLA₂s-símile (BthTX-I, PrTX-I) quanto às atividades citotóxica e miotóxica.

A atividade miotóxica foi realizada pela medida dos níveis de creatina cinase (CK) no plasma de camundongos de acordo com o item 3.5.10. Neste teste, foram incubadas as miotoxinas isoladamente ou previamente incubadas com α BaltMIP na razão molar 1:0,4 miotoxina/ α BaltMIP.

O inibidor plasmático de *Bothrops alternatus* foi capaz de neutralizar a atividade miotóxica de todas as miotoxinas testadas, apresentando uma inibição de cerca de 80% sobre PLA₂s-símbles Lys49, e cerca de 40% de inibição sobre PLA₂s Asp49 (Fig. 7A), observando-se maior especificidade do inibidor sobre as miotoxinas Lys49, BthTX-I e PrTX-I. Cabe ressaltar que a injeção do inibidor sozinho não induziu miotoxicidade nos animais testados.

A capacidade do α BaltMIP em inibir a citotoxicidade de PLA₂s também foi avaliada. Nesse experimento, assim como no ensaio de inibição da atividade miotóxica, pôde-se observar que o inibidor apresentou elevada inibição da citotoxicidade (cerca de 80%) induzida por PLA₂s-símile Lys49 (BthTX-I e PrTX-I) (Fig. 7B). Ademais, é interessante ressaltar, que como observado para a atividade miotóxica, o α BaltMIP apresentou uma maior especificidade sobre as miotoxinas Lys49, BthTX-I e PrTX-I. O inibidor sozinho não induziu citotoxicidade.

Apenas uma concentração do inibidor foi utilizada nas determinações das propriedades inibitórias das atividades citotóxica e miotóxica devido ao baixo rendimento da purificação do inibidor plasmático nativo, proveniente da serpente *Bothrops alternatus* (por volta de 1mg/5mL de plasma) e ao grande gasto de amostra que essas atividades propiciam. Futuros testes, mais específicos poderão ser realizados após a expressão heteróloga do inibidor recombinante.

Figura 7: (A) Neutralização da atividade mitotóxica induzida pelas miotoxinas BthTX-I, PrTX-I, PrTX-III e BthTX-II após incubação com α BaltMIP na razão molar 1:0,4 miotoxina/ α BaltMIP por 30 min a 37°C. (B) Neutralização da atividade citotóxica das miotoxinas Lys49 e Asp49 após prévia incubação com α BaltMIP na razão molar 1:0,4 miotoxina/ α BaltMIP por 30 min a 37°C. A atividade total de cada PLA₂ foi considerada como 100% de atividade. Resultados expressos como a média $\pm$ S.D. ($n = 5$) e os resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram indicados com asterisco (*); (**) evidencia uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a inibição da atividade mitotóxica de α BaltMIP frente as miotoxinas Lys49 PLA₂s símile.

4.4 Clonagem, determinação da sequência, estrutura terciária e estudos de dinâmica molecular do α BaltMIP

Para a realização da extração de RNA total, o fígado da serpente *Bothrops alternatus* foi extraído após o sacrifício da mesma, sendo que, logo em seguida o órgão foi congelado em nitrogênio líquido e triturado para a retirada do RNA total.

A partir do RNA total, assim como em todo processo de clonagem, foi necessária a purificação do RNA mensageiro (mRNA), pois o processo de clonagem de proteínas é feito com base na sequência dos mRNAs (RNA sem as sequências *splicings*, o qual codifica para a expressão de proteínas). A purificação desses mRNAs foi realizada através de esferas magnéticas, as quais possuem uma sequência Poli-T em sua estrutura, purificando assim, o mRNA por afinidade de sua cauda Poli-A. Para tanto, foram utilizados *Kits* comerciais (*TA Cloning Kit*, Invitrogen, EUA).

A etapa seguinte consistiu em obter as moléculas de cDNA correspondentes à população de mRNAs que codificam para α PLIs. Para tanto, as reações em cadeia da polimerase foram realizadas com oligonucleotídeos específicos concebidos com base na codificação de nucleotídeos de sequência para os α PLIs de *T. flavoviridis* (NOBUHISA et al., 1997).

Os produtos frescos da PCR foram então clonados em plasmídeo TA pCR 2.1 de acordo com as instruções do fabricante (*TA Cloning Kit*, Invitrogen, EUA). Em seguida, foi realizada a transformação de células competentes em *Escherichia coli* INV α F' e as possíveis colônias positivas foram confirmadas por PCR com *primers* correspondentes aos α PLIs.

A partir daí, os clones positivos foram selecionados aleatoriamente para o crescimento em meio líquido e o DNA recombinante foi purificado usando um kit comercial (*WizardPlusMinipreps*, Promega, EUA). Os DNAs foram completamente sequenciados em um sistema automatizado e as sequências completas de cDNA foram então depositadas no GenBank NCBI (EU421901 até EU421905).

Como mostrado anteriormente, a sequência N-terminal de α BaltMIP foi determinada por sequenciamento automático, utilizando o método de degradação de

Edman. A comparação desta sequência N-terminal da α BaltMIP com a sequência de aminoácidos deduzida a partir do cDNA de um α PLI de *Bothrops alternatus* (EU421904) apresentou 100% de identidade. Além disso, a sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos da proteína madura mostrou 147 resíduos de aminoácidos (Fig. 8).

Sendo assim, após a concretização desta parceria, dois clones desses α PLIs de *B. alternatus* foram doados pela professora supracitada [GenBank NCBI sob o número EU421904 (clone 10) e EU421902 (clone 06)], os quais continham a mesma sequência N-terminal do α BaltMIP nativo. Em seguida, foi realizada a subclonagem e expressão das proteínas recombinantes para os estudos futuros.

Como mostrado anteriormente, a sequência N-terminal do α BaltMIP foi determinada por sequenciamento automático, utilizando o método de degradação de Edman. A comparação dessa sequência N-terminal da α BaltMIP com a sequência de aminoácidos deduzida a partir do cDNA de um α PLI de *Bothrops alternatus* (EU421904) apresentou 100% de identidade, além disso, é interessante ressaltar que a sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos da proteína madura mostra 147 resíduos de aminoácidos (Fig. 8).

Ademais, foi realizado o alinhamento múltiplo de α BaltMIP com outros inibidores plasmáticos do tipo α de serpentes e com proteínas surfactantes pulmonares (SP-D) de *H. sapiens* e *Rattus norvegicus*, observando-se uma alta similaridade entre as sequências (Fig. 9), com resíduos conservados de cisteína nas posições 64, 119, 133 e 141, e o suposto sítio de glicosilação N103, característico de α PLIs.

```

ATG CGC CTG ATT CTG CTT TCC GGT CTT CTT CTT TTG GGA ATC TTT CTG GCC
M  R  L  I  L  L  S  G  L  L  L  L  G  I  F  L  A
AAC GGA CAT GAA CAA GAT CCT GAT GGA AAA TTG CTG AAT TCA TTG ATT GAT
N  G  H  E  Q  D  P  D  G  K  L  L  N  S  L  I  D
GCC CTA ATG CAC CTT CAA AGA GAG TTC GCC AAA CTG AGA GGC GCC TTC CTG
A  L  M  H  L  Q  R  E  F  A  K  L  R  G  A  F  L
ACA GTC TAC AAA GCC CGA TCC TTT GGG AAT GGC AGT GAA AGA TTG TAC GTG
T  V  Y  K  A  R  S  F  G  N  G  S  E  R  L  Y  V
ACC AAC AAG GAA ATC AAA AAC TTT GAA GCT CTG AGA CAG ATC TGT GAG CAA
T  N  K  E  I  K  N  F  E  A  L  R  Q  I  C  E  Q
GCC GGG GGC CAT ATC CCT TCC CCT CAA CTC GAA AAT CAG AAC AAG GCC TTC
A  G  G  H  I  P  S  P  Q  L  E  N  Q  N  K  A  F
GCA AAT GTT CTG GAG AGG CAC AAC AAA GAA GCC TAC CTT GTT GTG GGT GAC
A  N  V  L  E  R  H  N  K  E  A  Y  L  V  V  G  D
TCA GCA AAC TTC ACC AAC TGG GCT GCG GGA GAA CCG AAT AAG GCT GCT GGA
S  A  N  F  T  N  W  A  A  G  E  P  N  K  A  A  G
GCC TGT GTG AAA GCA GAT ACA CAC GGC TCC TGG CAC TCT ACG TCC TGT GAT
A  C  V  K  A  D  T  H  G  S  W  H  S  T  S  C  D
GAC AAC CTC TTA GTC GTG TGT GAG TTT TAT TTC ATT TTA TGA
D  N  L  L  V  V  C  E  F  Y  F  I  L  --

```

Figura 8: Sequência de cDNA e sequência deduzida de aminoácidos do inibidor de fosfolipase A₂ do tipo α oriundo do plasma da serpente *Bothrops alternatus* (EU421904). Os resíduos de aminoácidos sublinhados correspondem aos resíduos da região N-terminal da proteína nativa, os quais foram sequenciados por sequenciador automático por degradação de Edman (item 3.5.5).

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100
B.alternat : HEQDPDGKILNSI IDALMHLQREFAKIRGAFITVYKARSFGNGSERLYVTNKEIKNFALRQICEQAGGHIPSPCLNQNKAFAFNVLERHNKEAYLVVGD : 100
B.erythrcm : HEQDPDGKVLNSI IDALMHLQREFAKIRGAFITVYKARSFGNGSERLYVTNKEIKNFALRQICEQAGGHIPSPCLNQNKAFAFNVLERHNKEAYLVVGD : 100
B.neuwiedi : HEQDPDGKVLNSI IDALMHLQREFAKIRGAFITVYKARSFGNGSERMYVTNKEIKNFALRQICEQAGGHIPSPCLNQNKAFAFNVLERHKGKAYLVVGD : 100
B.jararaca : HEQDPDGKVLNSI IDALMHLQREFANIRGAFITVHKARSFGSGSERLYVTNKEIKNFALRQICEQAGGHIPSPCLNQNKAFAFNVLERHKGKAYLVVGD : 100
B.jararacu : HEQDPDGKVLNSI IDALMHLQREFANIRGAFITVHKARSFGSGSERMYVTNKEIKNFALRQICEQAGGHIPSPCLNQNKAFAFNVLERHKGKAYLVVGD : 100
B.moojeni : HEQDPDGKVLNSI IDSLMHLQREFANIKDAFITVHRARSFGSGSERLYVTNKEIKNFALRQICEQAGGHIPSPCLNQNKAFAFNVLERHKGKAYLVVGD : 100
T.flavovir : HETDPDGQVMSSMIETLMFLQKEYANIRYAFMTVNNARSFGSGSERLYVSNKEIKTFEPLKEICEQAGGHIPSPCLNQNKAFAFNVLERHNKAAYLVVGD : 100
G.b.siniti : HETDPDGKVLNSI MLIVMRLQREFSNIKDGFITVHKARSFGSGSERLYVTNKEVGNFEGIGEICRQAGGRIPSPCLNQNKAFAFNVLERHNKEAYLVVGD : 100
L.muta : HETDPDGKVLNSI SVIESVMILQREFANIKHAFITVHKARSFGSGSERLYVSNKEIKGFEALKEICDQAGGHIPSPCLNQNKAFAFNVLERHNKEAYLVVGD : 100
E.quadrivi : HETDPDGKVLNSI VETVGRLEKKIDKVENAFITVHRARSFGSGSERLYVTNKEVGNFEGIGEICRQAGGHIPSPCLNQNKAFAFNVLERHNKAAYLVVGD : 100
R.novergic : -----AYLLEELQTEIYEIKHQILQT--MGVLSLQGSMLSVGDKVFSTNGSVNFDTIKEMCTRAGGNIAVERTPEENBAIISTAKKYNMYVYIGMIEDQTPGDFH : 99
H.sapiens : ESGLEDVASIRQQVEALQGQVQHLQAAFSCYKKVELFPNGQSVGEEKIEKTAGFVKPTEAQLLCTCAGGCLASERSAAENFALQCLVAKNEAFISMTESKTEGKFT : 108

      *      120      *      140      *      160
B.alternat : ----SANTFNWARGEPNKAAG--ACVKADTHGSHWSTSCDDNLLVVFCEFYFIL : 147
B.erythrcm : ----SANTFNWARGEPNKAAG--TCVKADTHGSHWSTSCDDNLLVVFCEFYFIL : 147
B.neuwiedi : ----SANTFNWARGEPNKAAG--ACVKADTHGSHWSTSCDDNLLVVFCEFYFIL : 147
B.jararaca : ----SANTFNWARGEPNKAAG--ACVKADTHGSHWSTSCDDNLLVVFCEFYFIL : 147
B.jararacu : ----SANTFNWARGEPNKAAG--ACVKADTHGSHWSTSCDDNLLVVFCEFYFIL : 147
B.moojeni : ----SANTFNWARGEPNKAAG--TCVKADTHGSHWSTSCDDNLLVVFCEFYFIL : 147
T.flavovir : ----SANTFNWARGEPNKAAG--TCVKADTHGSHWSTSCDDNLLVVFCEFYFIL : 147
G.b.siniti : ----SANTFNWARGEPNKAAG--TCVKADTHGSHWSTSCDDNLLVVFCEFYFIL : 147
L.muta : ----SANTFNWARGEPNKAAG--TCVKADTHGSHWSTSCDDNLLVVFCEFYFIL : 147
E.quadrivi : ----SANTFNWARGEPNKAAG--TCVKADTHGSHWSTSCDDNLLVVFCEFYFIL : 147
R.novergic : YLDGASVSYTNWYFGEERGQG--KERCVEMYIDGTWNRDGLQYRIAVCEE---- : 148
H.sapiens : YPTGESLVYSNWARGEPNDDGSELCVEIFINGKWNDRACGEKRLVVFCEE---- : 158

```

Figura 9: Alinhamento múltiplo entre as sequências de resíduos de aminoácidos de α BaltMIP e outras sequências de α PLIs e SP-D gerado pelo programa AMAP v.2.2 (SCHWARTZ; PACHTER, 2007). Todas as sequências foram obtidas do banco de dados do NCBI. α PLIs: *Bothrops alternatus* (gi:215275473); *Bothrops erythromelas* (gi:215275474); *Bothrops neuwiedi* (gi:218546740); *Bothrops jararaca* (gi:215275475); *Bothrops jararacussu* (gi:167547115); *Bothrops moojeni* (gi:218546738); *Gloydius blomhoffii siniticus* (gi:6467183); *Lachesis muta* (gi:218546736); *Trimeresurus flavoviridis* (gi:160357989); *Elaphe quadrivirgata* (gi:82133672). Mammalian lung surfactant proteins D (SP-D): *Rattus norvegicus* (gi:39654792); *Homo sapiens* (gi:34810883).

Na tentativa de se obter características estruturais do inibidor α BaltMIP, vários modelos teóricos da sua estrutura tridimensional foram construídos utilizando-se técnicas de modelagem molecular.

Primeiramente, foi realizada uma busca para possíveis modelos estruturais para a modelagem do inibidor. Para tanto, foi utilizado os bancos de dados *Swiss-model* (<http://swissmodel.expasy.org>) e *MhoLL* (<http://www.mholline.lncc.br>) para analisar possíveis moldes para o cálculo do modelo estrutural de α BaltMIP a partir de sua sequência primária. O modelo estrutural mais indicado pelos sites *Swiss-model* e *MhoLL* para a modelagem de α BaltMIP foi a proteína surfactante pulmonar D de mamíferos (PDB: 2Ric, cadeia A), sendo assim utilizada para o cálculo dos modelos estruturais. Foram testados três modelos estruturais teóricos do inibidor, calculados pelo programa MODELLER 8v2 (Fig. 10), e estes foram em seguida submetidos à análise por diferentes programas (WHAT IF, VERIFY 3D e PROCHECK) para a escolha do melhor modelo para futuros testes.

Figura 10: Representações dos modelos teóricos de α BaltMIP obtidos por diferentes programas: **(A)** swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org>), **(B)** MhoLL (<http://www.mholline.lncc.br>), **(C, D e E)** MODELLER 8v2 (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007), nomeados como modelo 1, modelo 2 e modelo 3, respectivamente. Note que as alfa-hélices estão ilustradas em vermelho, as folhas-beta em amarelo e as *random-coil* em verde. Em todos os modelos pode-se notar o resíduo Asn103 correspondente ao sítio de glicosilação dos alfa-inibidores. Ilustrações geradas pelo programa PyMOL v.1.0 (DELANO et al., 2002).

Para a escolha do melhor modelo estrutural do α BaltMIP, como citado anteriormente, a análise foi baseada na qualidade estereoquímica dos modelos obtidos, utilizando os programas PROCHECK, WHAT IF, VERIFY 3D .

Inicialmente, para verificar a confiabilidade e compatibilidade entre a sequência primária e a estrutura tridimensional dos modelos teóricos do α BaltMIP, obtidos através de modelagem molecular, foi utilizado o programa VERIFY 3D (http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/) . O programa VERIFY 3D é um software gratuito disponível na internet, sendo bastante eficiente, o que facilita o seu uso. O VERIFY 3D mede a compatibilidade entre a sequência de aminoácidos de uma proteína e o modelo da sua estrutura tridimensional, usando um perfil 3D. Este software analisa a compatibilidade de um modelo atômico (3D), com sua sequência de resíduos de aminoácidos próprios (1D). A cada resíduo é atribuído uma classe estrutural com base na sua localização e do seu ambiente (alfa, beta, polar, não-polar, etc.). Um conjunto de boas estruturas é usado como uma referência para se obter uma pontuação para cada um dos 20 aminoácidos nesta classe estrutural. As pontuações de uma janela deslizante de 21 resíduos (de -10 a +10) são adicionadas e traçada para os resíduos individuais (Fig. 11).

De forma sucinta, o VERIFY 3D analisa a estrutura tridimensional de uma proteína pela média entre sua estrutura terciária por sua sequência primária, gerando um gráfico média 3D/1D *versus* número de resíduos. Os scores menores que “0” são considerados de baixa qualidade (Fig. 11).

Figura 11: Análise dos modelos do αBaltMIP realizada pelo programa VERIFY 3D . Foram realizadas cinco análises independentes de cada modelo obtido (http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/). Em preto, análise do modelo obtido pelo site Swis-model do expasy (<http://swissmodel.expasy.org/>). Em vermelho, análise do modelo obtido pelo site do Mholl (<http://www.mholline.lncc.br/>), em verde, amarelo e azul, análise dos modelos obtidos pelo programa MODELLER , chamados inicialmente de modelo 1, modelo2 e modelo 3, respectivamente.

Em seguida, uma segunda análise dos cinco modelos teóricos obtidos pelos diferentes programas (Swiss-model, Mholl, PROCHECK), foi realizada utilizando o programa WHAT IF (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>) (Fig. 12).

Este método também é chamado de Análise DACA (Contato Direcional Atômica, do inglês *Directional Atomic Contact Analysis*). A ideia principal deste método é que a distribuição de diferentes tipos de átomos é determinada em torno de fragmentos de aminoácidos. O programa então assume que a distribuição média observada teoricamente é representativo para o que pode acontecer na natureza. Ao contrário de muitos outros métodos, WHAT IF não realiza a média esférica da distribuição em torno do fragmento, mas mantém a direcionalidade dos contatos entre os eixos x, y, z. De acordo com esse método, a qualidade de qualquer estrutura é facilmente determinada por uma convolução das distribuições médias e os contactos das proteínas verificadas.

Resumidamente, o programa, por meio de calculos de estereoquímica de cada átomo, gera um gráfico com pontuações entre +10 a -10, de acordo com as especificações do programas, se um resíduo tem uma pontuação de -5,0 ou inferior, o resíduo em questão do modelo está em contato com um ligante ou um íon ou pode não estar correto (Fig. 12).

De acordo com os resultados das análises do VERIFY 3D e WHAT IF, o modelo gerado pelos softwares Swiss-model e Mholl, foram excluídos das análises, pois não apresentou bons parametros nas análises anteriores.

Figura 12: Análise dos modelos do α BaltMIP realizada pelo programa WHAT IF. Foram realizadas cinco análises independentes de cada modelo obtido (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>). Em preto, análise do modelo obtido pelo site Swis-model do expasy (<http://swissmodel.expasy.org/>). Em vermelho, análise do modelo obtido pelo site do Mholl (<http://www.mholline.lncc.br/>), em verde, amarelo e azul, análise dos modelos obtidos pelo programa MODELLER, chamados inicialmente de modelo 1, modelo2 e modelo 3, respectivamente.

Posteriormente, o programa PROCHECK foi utilizado para analisar a geometria global dos modelos. A principal análise apresentada no presente trabalho foi realizada através do Diagrama de Ramachandran, o qual analisa os ângulos de ligação ϕ (ϕ) e ψ (ψ) da cadeia principal. É interessante ressaltar que o programa PROCHECK realiza várias outras análises e determina diferentes parâmetros para a avaliação da qualidade estereoquímica da amostra.

De acordo com o gráfico de Ramachandran, as áreas representadas em branco correspondem a regiões onde existem os choques estereoquímicos na proteína. Estas regiões são denominadas de não permitidas. As áreas representadas em vermelho correspondem à conformação onde não há nenhum choque estereoquímico, ou seja, são as regiões permitidas. As áreas em amarelo escuro e claro mostram regiões limitantes, porém ainda ângulos permitidos ou generosamente permitidos, respectivamente. Os Diagramas de Ramachandran dos modelos gerados pelo MODELLER, nomeados como modelos 1, 2 e 3, estão representados nas figuras 13, 14 e 15, respectivamente.

O gráfico de Ramachandran do modelo 1, gerado pelo MODELLER (Figura 12) apresentou 119 resíduos de aminoácidos (90,8%) nas regiões favoráveis do gráfico, 11 resíduos (8,4%) nas regiões adicionalmente permitidas e 1 resíduo (0,8%) na região generosamente permitida, sendo que, essa análise não apresentou nenhum resíduo na região não permitida.

Figura 13: Diagrama de Ramachandran do modelo 1: Diagrama de Ramachandran gerado pelo PROCHECK para a avaliação da qualidade da estrutura tridimensional do modelo 1 gerado pelo MODELLER .

Adicionalmente, o diagrama de Ramachandran do modelo 2 (Figura 14) apresentou 121 resíduos de aminoácidos (92,4%) nas regiões favoráveis do gráfico, 9 resíduos (6,9%) nas regiões adicionalmente permitidas e 1 resíduo (0,8%) na região generosamente permitida, não apresentando nenhum resíduo na região não permitida.

Além disso, para o modelo 3 (Figura 15), a análise pelo diagrama de Ramachandran apresentou 122 resíduos de aminoácidos (93, 1%) nas regiões favoráveis do gráfico, 7 resíduos (5,3%) nas regiões adicionalmente permitidas e 2 resíduos (1,5%) na região generosamente permitida, sendo que, essa análise também não apresentou nenhum resíduo na região não permitida. Apesar das três análises anteriores não apresentarem nenhum resíduo na região não permitida, podemos observar a presença de pelo menos um resíduo de Glicina na região não favorável das três análises (região branca do diagrama), isso se deve ao fato que, como a glicina possui como cadeia lateral apenas um hidrogênio, ou seja, é o único aminoácido que não possui carbono α , sendo assim o único aminoácido que não é opticamente ativo (já que não possui estereoisômeros), ela possui angulos de rotação ϕ e ψ livres no diagrama, não interferindo na análise, nem na qualidade dos resultados, por isso, esses resíduos são apresentados como triângulos no diagrama.

De acordo com a análise no PROCHECK, um bom modelo apresenta pelo menos 90% de resíduos nas regiões mais favoráveis (Figuras 13, 14 e 15), sendo assim, podemos concluir que os três modelos apresentados possuem uma ótima qualidade estereoquímica, já que a análise apresentou 99,4%; 99,2 e 98,4% dos resíduos de aminoácidos nas regiões mais favoráveis no modelo 1, 2 e 3, respectivamente.

Figura 14: Diagrama de Ramachandran do modelo 2: Diagrama de Ramachandran gerado pelo PROCHECK para a avaliação da qualidade da estrutura tridimensional do modelo 1 gerado pelo MODELLER .

Figura 15: Diagrama de Ramachandran do modelo 3: Diagrama de Ramachandran gerado pelo PROCHECK para a avaliação da qualidade da estrutura tridimensional do modelo 1 gerado pelo MODELLER .

A partir das análises realizadas, foi selecionado o modelo 2 gerado pelo MODELLER, como o melhor material de trabalho para os próximos estudos, sendo esse considerado como estrutura terciária do monômero do α BaltMIP. Apesar dos outros modelos (principalmente os modelos 1 e 3 gerados pelo MODELLER) apresentarem um excelente *score* em todas as análises realizadas, o modelo 2 foi escolhido por apresentar um maior número de resíduos de aminoácidos nas regiões mais favoráveis no diagrama de Ramachandran e uma menor quantidade de resíduos nas regiões menos favoráveis.

A partir disso, foi realizada a análise da estrutura global do α BaltMIP, calculada após a simulação MD, as quais apresentaram as duas principais características estruturais dos α PLIs conservadas no modelo final (modelo 2): o “pescoço” α -hélice e o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), além da região responsável pela glicosilação da amostra (N103), e dos principais elementos estruturais secundários, que são duas α -hélices e cinco folhas β (Figura 16).

Figura 16: **(A)** Representação do modelo teórico do α BaltMIP final obtido após simulação de dinâmica molecular (MD) (BERENDSEN et al., 1995; LINDAHL et al., 2001). Os resíduos 11-37 e 49-143, correspondem, respectivamente, a região do pescoço α -helicoidal e domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), o resíduo Asn103 corresponde ao sítio de glicosilação e é preservado em todas as seqüências de α PLI de serpentes. Ilustração gerada pelo programa PyMOL v.1.0 (DELANO et al., 2002). **(B)** Valores médios da estrutura atômica RMSF do monômero α BaltMIP calculado pelo programa GROMACS v.4.0.2 (BERENDSEN et al., 1995; LINDAHL et al., 2001). A linha vertical separa a região “pescoço” α -helicoidal da região do domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) com o intuito de enfatizar a alta flexibilidade apresentada pelo primeiro segmento.

A partir das conclusões obtidas com os resultados da modelagem molecular do monômero do α BaltMIP e com base na literatura, a qual afirma que os alfa inibidores de miotoxinas (classe na qual, o α BaltMIP está classificado) comportam-se como trímeros em solução, foi realizada a modelagem molecular dessa proteína para analisar sua capacidade de oligomerização. É interessante elucidar, que, como o programa MODELLER V8 mostrou-se mais eficiente que os programas do Mhold e Swiss-model, dessa vez somente o MODELLER foi utilizado para a análise de modelagem molecular do α BaltMIP em sua composição oligomérica.

Inicialmente, assim como realizado para as análises de modelagem molecular do monômero do α BaltMIP foi selecionado como molde mais apropriado para o estudo, a proteína surfactante pulmonar D de mamíferos (PDB: 2Ric), com apenas uma diferença, ao invés de selecionar apenas a Cadeia A do molde, foram selecionados as cadeias A, B e C do trímero 2Ric (é interessante ressaltar que a proteína surfactante pulmonar D de mamíferos também se comporta como um trímero em solução).

Definido o molde, as análises foram submetidas ao software MODELLER V8, com 2 angstroms de resolução e três modelos principais foram selecionados (Figuras 17, 18 e 19). Em resumo, os modelos obtidos se comportaram como trímeros, ligados pela “região pescoço” de alfa hélices de cada monômero, apresentando suas regiões CRDs expostas ao meio.

Posteriormente, os modelos foram submetidos à análise de sua estrutura terciária por diferentes programas (WHAT IF, VERIFY 3D e PROCHECK) e o melhor modelo foi considerado para futuros testes de docking molecular.

Figura 17: Representação do modelo teórico do α BaltMIP, nomeado como Trímero 1, obtido através do programa MODELLER. **(A)** visão da região superior do trímero do α BaltMIP, evidenciando a região CRD de cada monômero **(B)** Vista lateral do trímero, enfatizando a região pescoço dos monômeros **(C)** Visão inferior do trímero, ilustrando a “região pescoço” dos monômeros (região responsável pela ligação entre os três monômeros) . Note que cada monômero é ilustrado de uma cor diferente (verde, laranja e roxo) para melhor visualização das cadeias. Ilustrações geradas pelo programa PyMOL v.1.0 (DELANO et al., 2002).

Figura 18: Representação do modelo teórico do α BaltMIP, nomeado como Trímero 2, obtido através do programa MODELLER. **(A)** visão da região superior do trímero do α BaltMIP, evidenciando a região CRD de cada monômero **(B)** Vista lateral do trímero, enfatizando a região pescoço dos monômeros **(C)** Visão inferior do trímero, ilustrando a “região pescoço” dos monômeros (região responsável pela ligação entre os três monômeros) . Note que cada monômero é ilustrado de uma cor diferente (verde, laranja e roxo) para melhor visualização das cadeias. Ilustrações geradas pelo programa PyMOL v.1.0 (DELANO et al., 2002).

Figura 19: Representação do modelo teórico do α BaltMIP, nomeado como Trímero 3, obtido através do programa MODELLER. **(A)** visão da região superior do trímero do α BaltMIP, evidenciando a região CRD de cada monômero **(B)** Vista lateral do trímero, enfatizando a região pescoço dos monômeros **(C)** Visão inferior do trímero, ilustrando a “região pescoço” dos monômeros (região responsável pela ligação entre os três monômeros) . Note que cada monômero é ilustrado de uma cor diferente (verde, laranja e roxo) para melhor visualização das cadeias. Ilustrações geradas pelo programa PyMOL v.1.0 (DELANO et al., 2002).

Para a escolha do melhor modelo estrutural do trímero do α BaltMIP, os modelos gerados por análises *in silico* foram submetidos à análise de suas propriedades estereoquímicas, utilizando os programas PROCHECK, WHAT IF, VERIFY 3D .

Para verificar a confiabilidade e compatibilidade entre a sequência primária e a estrutura tridimensional dos modelos teóricos dos trímeros, obtidos através de modelagem molecular, foi utilizado o programa VERIFY 3D (http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/), assim como na análise da qualidade dos modelos propostos como monômeros do α BaltMIP.

Em seguida, uma segunda análise dos modelos triméricos teóricos obtidos (Swiss-model, Mholl, PROCHECK), foi realizada utilizando o programa WHAT IF (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>).

De acordo com os resultados das análises do VERIFY 3D e WHAT IF, apesar de todos os modelos apresentarem excelente qualidade, o modelo 1 demonstrou ser o mais indicado como estrutura terciária do trímero de α BaltMIP, como pode-se observar na figura 20.

Figura 20: Comparativo das análises da qualidade da estrutura terciária dos trímeros do α BaltMIP. **(A)** Análise dos modelos triméricos do α BaltMIP realizada pelo programa WHAT IF. Foram realizadas análises independentes de cada modelo obtido (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>). **(B)** Análise dos modelos triméricos do α BaltMIP realizada pelo programa VERIFY 3D. Foram realizadas análises independentes de cada modelo obtido (http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/).

Posteriormente, para uma análise mais refinada dos trímeros obtidos, o programa PROCHECK foi utilizado para o exame da geometria global dos modelos. Os Diagramas de Ramachandran dos modelos dos trímeros 1, 2 e 3, gerados pelo MODELLER, estão representados nas figuras 21, 22 e 23, respectivamente.

O gráfico de Ramachandran do trímero 1, gerado pelo MODELLER (Figura 21) apresentou 368 resíduos de aminoácidos (93,6%) nas regiões favoráveis do gráfico, 22 resíduos (5,6%) nas regiões adicionalmente permitidas e 3 resíduos (0,8%) na região generosamente permitida, sendo que, essa análise não apresentou nenhum resíduo na região não permitida.

Adicionalmente, o diagrama de Ramachandran do trímero 2 (Figura 22) apresentou 356 resíduos de aminoácidos (90,6%) nas regiões favoráveis do gráfico, 29 resíduos (7,4%) nas regiões adicionalmente permitidas e 6 resíduos (1,5%) na região generosamente permitida, apresentando 2 resíduos (0,5%) na região não permitida. Como esse modelo apresentou resíduos na região não permitida, foi prontamente descartado.

Além disso, para o modelo do trímero 3 (Figura 23), a análise pelo diagrama de Ramachandran apresentou 370 resíduos de aminoácidos (94, 1%) nas regiões favoráveis do gráfico e 23 resíduos (5,9%) nas regiões adicionalmente permitidas, não apresentando nenhum resíduo de aminoácido nem na região generosamente permitida e nem na região não permitida, demonstrando uma excelente qualidade desse modelo.

Figura 21: Diagrama de Ramachandran do estrutural do Trímero 1: Diagrama de Ramachandran gerado pelo PROCHECK para a avaliação da qualidade da estrutura tridimensional do modelo 1 gerado pelo MODELLER. Note em verde os resíduos presentes nas regiões menos favoráveis.

Figura 22: Diagrama de Ramachandran do estrutural do Trímero 2: Diagrama de Ramachandran gerado pelo PROCHECK para a avaliação da qualidade da estrutura tridimensional do trímero 2 gerado pelo MODELLER. Note em verde os resíduos presentes nas regiões menos favoráveis. Observe também os resíduos Gln 150 e Tyr 144 presentes na região não favorável.

Figura 23: Diagrama de Ramachandran do estrutural do Trímero 3: Diagrama de Ramachandran gerado pelo PROCHECK para a avaliação da qualidade da estrutura tridimensional do trímero 3 gerado pelo MODELLER.

Com a utilização de diferentes metodologias pôde-se atestar a qualidade estrutural dos modelos, além de constatar pelo PROCHECK que dois dos modelos gerados (trímero 1 e trímero 3) não apresentaram nenhum resíduo na região não permitida e apresentaram pelo menos 90% de resíduos nas regiões mais favoráveis. Além disso, essa análise mostrou que o modelo de estrutura quaternária do α BaltMIP chamada trímero 2, contém resíduos de aminoácidos na região não permitida.

Apesar dos modelos nomeados trimeros 1 e 3 apresentarem excelente estrutura e qualidade (atestados principalmente pelas análises do WHAT IF e VERIFY 3D), o diagrama de Ramachandran do trímero 3 mostra uma maior qualidade dessa estrutura.

Com isso, após a análise dos modelos oriundos da modelagem molecular pelo programa PROCHECK V8 concluiu-se que o melhor modelo de estrutura quaternária do α BaltMIP é o trímero 3, partindo daí que esse modelo é a estrutura tridimensional do α BaltMIP em solução.

Em seguida, assim como a simulação de dinâmica molecular (MD) foi realizada com um único monômero, um oligômero trimérico foi montado e submetido a um anelamento simulado, para o refinamento do teste (JONES, et al., 1990; BRÜNGER, et al., 1998), a fim de verificar, especificamente, se o α BaltMIP também poderia trimerizar assim como outros α PLIs oriundos de plasma de serpentes, como proposto por vários autores.

O resultado desse anelamento simulado mostrou que os três monômeros do α BaltMIP ajustaram-se bem em um arranjo esférico trimérico, com raio aproximado (3,75 nm) (Figura 24), é bastante próximo do valor de R_H (3,6 nm), calculado nos experimentos de DLS a 10°C.

Outra característica interessante sobre o modelo teórico trimérico do α BaltMIP é uma torção perceptível entre as regiões α -hélice, que formam a “região pescoço” no modelo, indicando que uma destas partes da molécula pode desempenhar um papel importante na trimerização.

Curiosamente, a média da raiz quadrada de flutuação (RMSF) dos átomos da região α -helicoidal desses “pescoços” durante a simulação de dinâmica molecular indica que essas regiões são altamente flexíveis em relação a outros segmentos da molécula monomérica (Figura 16B).

Por conseguinte, um arranjo trimérico possível do α BaltMIP realizado por meio de interações entre as regiões α -hélice da “região pescoço”, pode apresentar a vantagem adicional de evitar possíveis contatos desfavoráveis desses segmentos, com sítios inespecíficos das PLA₂ em um complexo, cuja razão molar foi de 1:1.

Por outro lado, os ensaios de dicroísmo circular (DC), demonstraram que o complexo α BaltMIP/PLA₂ é, provavelmente, mais compacto em relação às proteínas separadas devido ao aumento relativo dos segmentos helicoidais. Esta hipótese indica que a ligação com a PLA₂ poderia até induzir modificações estruturais nos α PLIs para otimizar e/ou acelerar a formação de complexos inibitórios como o sugerido aqui (formação de um oligômero trimérico de α PLIs e uma molécula de PLA₂). Essa hipótese parece razoavelmente provável quando considerado que a concentração dos α PLIs no plasma de serpentes deve ser bem menor, em comparação com as condições dos procedimentos experimentais realizados com o α BaltMIP purificado.

Figura 24. Trimerização hipotética do α BaltMIP. Os três monômeros se ajustaram bem em um arranjo trimérico esférico cujas dimensões máximas (cerca de 7,5 nm) indicam que o raio aproximado do oligômero é próximo ao R_H (3,6 nm) calculado pelos experimentos de DLS a 10°C. Também é possível observar uma leve torção entre as regiões do “pescoço” α -helicoidal, sugerindo a provável importância destas regiões para a conformação oligomérica. Ilustração gerada pelo programa PyMOL v.1.0.

4.5 Subclonagem e expressão do *rBaltMIP*

4.5.1 Subclonagem do cDNA do α BaltMIP

Como anteriormente citado, dois clones que codificam a proteína α BaltMIP, os quais têm suas sequências depositadas no GenBank NCBI sob o número EU421904 (clone 10) e EU421902 (clone 06) foram cedidos pela Prof^a Dr^a Consuelo L. Fortes-Dias e pela Dr^a Maria Inácia Estevão-Costa.

Em seguida, oligopeptídeos específicos com sítios para as enzimas de restrição *Xho*I e *Sa*II foram desenhados com base na sequência do inibidor α BaltMIP obtida na biblioteca de cDNA previamente realizada. Além disso, com o intuito de se obter proteínas com região N-terminal nativa, foi adicionado nestes oligonucleotídeos um sítio de clivagem da protease Kex2, adjacente ao sítio para *Xho*I.

Após a reação de PCR, os fragmentos resultantes correspondentes aos genes do α BaltMIP foram eficientemente clonados, apresentando tamanhos compatíveis com os preditos em gel de agarose 1% (500 pb) (Fig. 25).

Figura 25: Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da PCR dos cDNAs correspondentes ao α BaltMIP. MM-Marcador Molecular Gene Ruler 1Kb (Fermentas); α BaltMIP-cDNA correspondente ao α BaltMIP maduro (500 pb).

4.5.2 Construção do Vetor de Expressão pPICZαA - αBaltMIP

Para a realização desse trabalho, o vetor de expressão escolhido foi o pPICZαA (3593 pb) e as condições de expressão foram realizadas de acordo com o fabricante (*EasySelectTM Pichia Expression Kit*, Version G, Invitrogen). Este vetor apresenta um peptídeo sinal que consiste no fator de acoplamento alfa (αMF - *α mating factor*) de *Saccharomyces cerevisiae* (vetor esse que sinaliza para a secreção celular das proteínas recombinantes), gene de resistência a zeocina (para a seleção das colônias) e gene que codifica uma cauda de poli-histidina (a qual poderá ser bastante útil numa futura purificação da proteína recombinante), além de vários sítios de clonagem. As características deste vetor de expressão estão sumarizadas na Figura 26.

Figura 26: Características do vetor de expressão pPICZα. A sequência completa desse vetor pode ser encontrada no site www.invitrogen.com. Fonte: EasySelect™ Pichia Expression Kit, Version G, Invitrogen.

Após a amplificação por PCR, o vetor e os genes amplificados foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *Sall* para geração de extremidades adesivas complementares. Após a reação de ligação, o vetor pPICZ α A- α BaltMIP foi então utilizado para a transformação de células de *E. coli* por choque térmico e as colônias transformadas foram cultivadas em meio contendo zeocina para a amplificação do vetor.

Logo em seguida, as colônias selecionadas, através da resistência à zeocina foram submetidas a PCR de colônia utilizando o oligonucleotídeo senso *α -factor* (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') (Invitrogen) e o antisenso sintetizado para subclonagem do gene (item 3.5.14). Os produtos da reação foram visualizados em gel de agarose a 1% para a confirmação da presença do inserto (Figura 27).

Figura 27: Análise da PCR de colônias de *E. coli* transformadas com o vetor pPICZαA – αBaltMIP. As colônias consideradas positivas apresentam banda de DNA com aproximadamente 500 pb. Os números das colunas correspondem aos números dos clones. MM - marcador molecular *Gene Ruler* 1Kb (Fermentas), B - controle negativo (branco).

As colônias que apresentavam tamanhos aproximados de 500 pb, tamanho este correspondente ao α BaltMIP maduro (500 pb), foram consideradas positivas. Onze colônias foram analisadas, sendo que nove foram positivas e duas foram consideradas negativas. O DNA plasmidial das colônias positivas foram extraídos por *mini-prep* e submetidos ao sequenciamento com os mesmos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR para a confirmação da correta orientação do inserto. O resultado do sequenciamento demonstrou que a fusão do inserto no vetor ocorreu na orientação correta, com a sequência do α -factor seguida dos sítios para *Xho*I e *Kex*2, gene codificante da proteína de interesse, sítio para *Sal*I e cadeia de polihistidina.

4.5.3 Transformação em *Pichia pastoris* KM71H

As células da linhagem KM71H (*Mut*^s, *His*4, *Arg*4) de *P. pastoris* foram transformadas via integração ao DNA cromossomal. Previamente à transformação, os vetores contendo o gene do α BaltMIP foram linearizados com a enzima de restrição *Pme*I, direcionando a integração ao locus *aix1::ARG4* do genoma de *P. pastoris* por meio de recombinação homóloga. A linearização do vetor foi visualizada em gel de agarose 1% apresentando banda de aproximadamente 4044 pb, que consiste no tamanho esperado para o vetor contendo o gene heterólogo (Figura 28).

Figura 28: Gel de agarose 1% do plasmídeo recombinante pPICZαA- αBaltMIP, linearizado por digestão com a enzima de restrição *PmeI*. MM, marcador molecular *Gene Ruler* 1Kb (Fermentas). αBaltMIP, vetor recombinante contendo gene que codifica o αBaltMIP maduro.

Após a transformação, as células de *P. pastoris* foram cultivadas em meio contendo 100 µg/mL de zeocina para seleção de colônias resistentes. Para a seleção de colônias recombinantes contendo múltiplas cópias do gene, as células transformadas foram plaqueadas em meio contendo 500 µg/mL de zeocina. As colônias resistentes foram submetidas a PCR para confirmação da integração do vetor ao DNA cromossomal, utilizando o oligonucleotídeo senso sintetizado para a clonagem (item 3.3.1.) e o *primer* antisenso 3'AOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') (Invitrogen). As colônias consideradas positivas para a integração do vetor, apresentaram banda de DNA de aproximadamente 636 pb, que consiste no tamanho esperado do inserto, demonstrando assim a eficiência da transformação (Figura 29).

Figura 29: Análise do PCR de colônias de *P. pastoris* transformadas com o vetor pPICZαA -αBaltMIP linearizado. As colônias consideradas positivas para a integração do vetor, apresentaram banda de DNA de aproximadamente 636 pb, que consiste no tamanho esperado do inserto, demonstrando assim a eficiência da transformação. Os números das colunas correspondem aos números dos clones. MM, marcador molecular gene Ruler 1Kb (Fermentas); ctl-, controle negativo.

4.5.4 Triagem em Placa da Expressão, purificação e caracterização da proteína Recombinante (rBaltMIP)

Os vetores transformados em *P. pastoris* permitiram a expressão de α BaltMIP recombinante fusionado com seis resíduos de histidina em sua porção C-terminal. Com o objetivo de avaliar a colônia de *P. pastoris* que expressou a proteína recombinante em maior escala, um *screening* de expressão em placa foi realizado. Para isso, oito colônias selecionadas em meio contendo 500 μ g/mL de zeocina foram utilizadas para a expressão em baixa escala. A expressão consistiu em duas etapas: a primeira etapa com o objetivo de promover um rápido crescimento celular, na qual a cultura de células foi suprida de glicerol como fonte de carbono, e a segunda etapa, consistiu na indução da expressão de proteínas pela adição de metanol ao meio. Após 72 e 144 h de indução, o sobrenadante das culturas foi analisado em gel SDS-PAGE a 12% corado com *Comassie Brilliant Blue* para determinação dos níveis de expressão.

Com isso, foi observado, que algumas colônias apresentaram grande expressão com 72 h de indução com metanol (Figura 30), já outras colônias apresentaram melhor indução com 144 h e outras colônias não apresentaram bandas na posição esperada (~24.000) em SDS-PAGE 12%, em ambas as induções. Desta forma, para a futura purificação dos inibidores recombinantes (rBaltMIP), foram utilizadas colônias que expressaram uma boa quantidade já em 72 h de indução, para uma maior otimização da expressão e, em seguida, realização dos testes de inibição do rBaltMIP e demais testes.

Figura 30: Triagem em placa da expressão do α BaltMIP recombinante em *P. pastoris*. Gel de poliacrilamida 12% corado com *Comassie Brilliant Blue* contendo o sobrenadante das culturas celulares com 72 h (**A**) e 144 h (**B**) de indução por metanol. MM, Padrão de peso molecular (α -Lactalbumina 14,4; Inibidor de tripsina 20.100; Anidrase carbônica 30.000; Ovalbumina 45.000; Soralbumina bovina 66.000 e Fosforilase b 97.000); colônias apresentando múltiplas cópias gênicas selecionadas em meio contendo 500 μ g/mL de zeocina.

Como citado anteriormente, foram selecionadas as colônias que apresentaram expressão significativa de proteínas após 72 h de indução, e que mostraram bandas na posição de ~24 kDa (posição esperada para o inibidor expresso) em SDS-PAGE 12%. Para a purificação do rBaltMIP o sobrenadante de colônia foi submetido a uma coluna de Ni-Sepharose. Logo após, a amostra eluída da cromatografia de Ni-Sepharose (rBaltMIP) foi submetida a uma cromatografia de fase reversa em HPLC para a eliminação das impurezas (Figura 31A), mostrando um perfil bem próximo ao do inibidor nativo (Figura 31B). A amostra pura, nomeada como rBaltMIP, apresentou um alto grau de pureza, tanto na cromatografia em HPLC, quanto em eletroforese na presença e ausência do agente redutor β -mercaptoetanol (Fig 31 C e D). O inibidor expresso apresentou-se como uma única banda na presença de agente redutor, com massa molar de aproximadamente 24.000 (Fig 31D).

Outra técnica importante para avaliar o grau de pureza da amostra é o sequenciamento dos resíduos a partir do N-terminal da proteína. Nesse experimento, foram sequenciados os primeiros 36 resíduos de aminoácidos do rBaltMIP, obtendo a sequência HEQDPDGKLLNSLIDALMHLQREFAKLRGAFLYVY, com 100% de identidade com o sequenciamento realizado também em sequenciador automático dos resíduos do N-terminal da proteína nativa e também com os resíduos de aminoácidos preditos do cDNA obtido anteriormente (Fig. 32A).

Em seguida, as amostras nativa (α BaltMIP) e recombinante (rBaltMIP) foram dissolvidas em água ultrapura, centrifugadas e submetidas a análise de DC na concentração de 250 μ g/ml, no volume de final de 100 μ L. Os espectros *Far* UV resultantes (Fig. 32B) apresentaram diferenças discretas entre a proteína nativa e recombinante, o que pode ser explicado pela presença de algum contaminante, ou em α BaltMIP ou em rBaltMIP.

Figura 31: Purificação do rBaltMIP. A amostra eluída da cromatografia de Ni-Sepharose (rBaltMIP) foi submetida a uma cromatografia com coluna de fase reversa em sistema de alta performance (HPLC) para a eliminação das impurezas **(A)**. Cromatografia em coluna de fase reversa em sistema de alta performance (HPLC) da proteína α BaltMIP nativa purificada a partir do plasma da serpente *Bothrops alternatus* **(B)**. **(C)** - SDS-PAGE 12% da cromatografia Ni-Sepharose e das eleições resultantes (1 - marcador de massa molecular Bench Mark (Invitrogen); 2 - proteína eluída com 75mM de imizadol; 3 - proteína eluída com 100mM de imizadol (a); 4 - proteína eluída com 100mM de imizadol (b); 5 - proteína eluída com 250mM de imizadol (a); 6 - proteína eluída com 250mM de imizadol (b); 7 - proteína eluída com 250mM de imizadol (c))., **(D)** - SDS-PAGE 12% da fração principal proveniente da cromatografia em fase reversa de quatro expressões independentes **1, 2, 3, 4** - amostras na presença do agente redutor beta-mercaptoetanol, 5 - PPM, **6, 7, 8, 9** - amostras na ausência do agente redutor beta-mercaptoetanol. As proteínas dos padrões de peso molecular e suas respectivas massas relativas são: α -Lactalbumina 14.4; Inibidor de tripsina 20.100; Anidrase carbônica 30.000; Ovalbumina 45.000; Soralbumina bovina 66.000 e Fosforilase b 97.000.

Figura 32: Caracterização das estruturas primária e secundária do rBaltMIP. **(A)** Sequência dos resíduos de aminoácidos do inibidor de miotoxinas proveniente de *Bothrops alternatus* deduzidos a partir do cDNA. Os resíduos sublinhados em preto correspondem à sequência da proteína nativa (α BaltMIP) obtida por sequenciamento automático, já, os resíduos sublinhados em vermelho correspondem à sequência N-terminal dos resíduos de aminoácidos da proteína recombinante (rBaltMIP) sequenciados também em sequenciador automático por degradação de Edman. **(B)** Espectro de CD em *Far UV* da proteína nativa (α BaltMIP) e da proteína recombinante (rBaltMIP).

4.6 Atividades de neutralização das PLA_2 s Asp49 e PLA_2 s-símile Lys49 pela proteína recombinante rBaltMIP

Depois de purificado, o inibidor expresso foi testado para avaliar sua capacidade de inibir a atividade fosfolipásica (item 3.5.8) de diferentes PLA_2 s Asp49 (BthTX-II, PrTX-III, BthA-I- PLA_2 e CB) previamente incubadas sozinhas ou na presença de rBaltMIP em diferentes proporções molares (1:0,2; 1:0,4; 1:0,6; 1:1 e 1:3) por 30 minutos e só então aplicadas à placa (Figura 33).

Nesta atividade, assim como visto com a proteína nativa, foi possível observar uma discreta redução na atividade fosfolipásica das Asp49 PLA_2 s, principalmente nas proporções molares 1:1 e 1:3 (PLA_2 /PLI), apresentando valores inibitórios máximos de aproximadamente 40%, sobre as enzimas BthTX-II e PrTX-III, quando utilizada a proporção molar Inibidor/toxina 1:3 (Figura 33).

Além disso, foi realizada a incubação das PLA_2 s/rBaltMIP na concentração molar 1:3, para testar a proporção ideal PLA_2 /inibidor. O teste de inibição da atividade fosfolipásica da PrTX-III foi realizado apenas em duas concentrações devido a grande quantidade de amostra necessária para a realização dos vários testes e principalmente à dificuldade de obtenção desta enzima.

Figura 33: Caracterização das propriedades inibitórias do rBaltMIP frente às diferentes PLA₂s Asp49. Atividade de inibição das propriedades enzimáticas das PLA₂s Asp49 BthTX-II (**A**), CB (**B**), PrTX-III (**C**). As enzimas foram previamente incubadas com o inibidor em diferentes razões molares PLA₂/PLI (mol/mol) 1:0,2; 1:0,4; 1:0,6; 1:1 e 1:3. A atividade total de cada PLA₂ foi considerada como 100% de atividade. O inibidor rBaltMIP foi incubado sozinho para testar se possui atividade fosfolipásica, o que não ocorreu. Resultados expressos como a média $\pm$ SD (n=3) e os resultados estatisticamente significantes (p<0,05) foram indicados pelo asterisco (*).

Em seguida, foi avaliada a propriedade inibitória do rBaltMIP frente a diferentes toxinas Asp49 PLA₂s (BthTX-II, PrTX-III), e Lys49 PLA₂s (BthTX-I, PrTX-I) em relação à atividade citotóxica dessas moléculas.

Nesse experimento, realizado em linhagens celulares C2C12, através do ensaio colorimétrico utilizando o MTT, pôde-se observar que o inibidor apresentou elevado aumento da viabilidade celular, principalmente quando previamente incubado com BthTX-I e PrTX-I, as quais apresentaram viabilidade de aproximadamente 25% quando incubadas as PLA₂s Lys49 sozinhas e, quando previamente incubadas com rBaltMIP, apresentaram uma viabilidade de cerca de 90% (Figura 34).

Um dado interessante é que as PLA₂s Asp49 BthTX-II e PrTX-III apresentaram pequeno potencial citotóxico, com cerca de 50% de viabilidade celular quando incubadas sozinhas e cerca de 75% de viabilidade celular após incubação prévia com rBaltMIP, por isso, pode-se dizer que rBaltMIP inibiu com menos eficiência essas moléculas.

Além disso, como também observado para a atividade miotóxica e citotóxica do αBaltMIP, o inibidor recombinante apresenta uma maior especificidade sobre as miotoxinas Lys49, BthTX-I e PrTX-I.

Figura 34: Neutralização da atividade citotóxica. Inibição da citotoxicidade induzida por diferentes PLA₂s e PLA₂s símile em linhagens celulares C2C12. A atividade citotóxica foi avaliada pela viabilidade celular observada através do teste colorimétrico do MTT. rBaltMIP foi previamente incubada por 30 min a 37°C com: BthTX-I (**A**), BthTX-II (**B**), PrTX-I (**C**), PrTX-III (**D**). Resultados expressos como a média $\pm$ S.D. (n = 3) e os resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) estão marcados com *.

Posteriormente, foi testado a possibilidade do rBaltMIP inibir a atividade miotóxica de miotoxinas Asp49 e Lys49 PLA₂s. Como a disponibilidade do inibidor expresso é maior que do inibidor nativo, foram testadas varias diferentes proporções de miotoxina/inibidor.

Assim como realizado com a proteína nativa, o teste de inibição da atividade miotóxica foi realizado pela medida dos níveis de creatina cinase (CK) no plasma de camundongos (item 3.5.10), os quais foram injetados com as miotoxinas isoladas ou previamente incubadas com rBaltMIP na razão molar de 1:0,2; 1:0,4; 1:0,6; 1;1 (miotoxina/ α BaltMIP) (Fig. 35). Além disso, foi testado a inibição de BthTX-I incubada com rBaltMIP na proporção molar 1:2 (BthTX-I/rBaltMIP) (Fig. 35A).

O inibidor expresso foi eficaz em diminuir a miotoxicidade das toxinas testadas (Fig. 35), sendo estatisticamente significantes ($p < 0.05$) as inibições em proporções molares toxina:inibidor maiores que 1:0,4. Além disso, rBaltMIP inibiu principalmente as miotoxinas BthTX-I e PrTX-I, ambas Lys49 PLA₂s-símile (Fig. 35A e D), observando-se mais uma vez maior especificidade desses inibidores sobre as miotoxinas Lys49. Contudo, pode-se notar que apesar de uma maior eficiência de inibição frente as Lys49 PLA₂s-símile, rBaltMIP apresentou inibição frente as miotoxinas PLA₂s Asp49 (por volta de 50%) (Fig. 35B e C). É interessante ressaltar que a injeção do inibidor sozinho não induziu miotoxicidade nos animais testados.

Figura 35: Neutralização da atividade miotóxica das miotoxinas Lys49 e Asp49 BthTX-I (**A**), BthTX-II (**B**); PrTX-III (**C**); PrTX-I (**D**) após incubação com rBaltMIP por 30 min a 37°C. A atividade total de cada miotoxina foi considerada como 100% de atividade. Resultados expressos como a média $\pm$ S.D. ($n = 6$) e os resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram marcados com *; (**) evidencia uma diferença estatisticamente significativa entre a inibição da atividade miotóxica do rBaltMIP frente às miotoxinas Lys49 PLA₂s símile.

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 de diferentes miotoxinas PLA₂s Asp49 e PLA₂s-símile Lys49 sem a prévia incubação das miotoxinas com o inibidor.

Para tanto, foi realizado a medição dos níveis de creatina cinase (CK) no plasma de camundongos, os quais receberam injeção intramuscular no músculo gastrocnêmio contendo PBS sozinho ou as miotoxinas isoladas. Após 30 minutos outra injeção foi realizada no músculo gastrocnêmio dos animais, contendo 25 µL de PBS nos grupos controle (controle negativo contendo PBS nas duas injeções e controle da atividade miotóxica de cada toxina, o qual foi injetado a miotoxina na primeira injeção e PBS na segunda) ou 25 µL de diferentes concentrações do inibidor rBaltMIP (Fig. 36).

A injeção do inibidor foi calculada, assim como em todas as atividades desse trabalho, em razão da proporção da massa molar das miotoxinas e do inibidor. Para essa atividade, todos os ensaios inibitórios foram realizados na proporção 1:1 (miotoxina/inibidor).

rBaltMIP apresentou um interessante potencial na utilização desses inibidores plasmáticos na terapêutica de envenenamentos, com a inibição da atividade miotóxica das miotoxinas presentes nas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*. Assim como em todas as atividades citotóxicas e miotóxicas realizadas até o momento rBaltMIP apresentou maior especificidade frente as miotoxinas Lys49 PLA₂s-símile.

Figura 36: Neutralização da atividade miotóxica das miotoxinas Lys49 e Asp49 BthTX-I, BthTX-II; PrTX-III; PrTX-I. 30 minutos após a injeção das miotoxinas no músculo gastrocnêmio, rBaltMIP foi injetado no mesmo músculo. Todas as injeções foram realizadas na proporção molar miotoxina/inibidor (1:1). A atividade total de cada miotoxina foi considerada como 100% de atividade. Resultados expressos como a média $\pm$ S.D. (n = 6) e os resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram marcados com *.

Como observado nas atividades miotóxicas por meio da medição da quantidade da enzima creatina cinase presente no plasma dos camundongos, o rBaltMIP foi capaz de diminuir a atividade miotóxica de diferentes miotoxinas presentes nas peçonhas botrópicas, tanto com a prévia incubação do alfa inibidor recombinante com as miotoxinas, quanto sem a prévia incubação inibidor/toxina, simulando um possível envenenamento com posterior aplicação do inibidor (30 minutos após).

Para reafirmar essa hipótese, análises histopatológicas de músculos gastrocnêmios de camundongos foram realizadas após a injeção de diferentes miotoxinas (BthTX-I, BthTX-II, PrTX-I, PrTX-III) ou dessas miotoxinas previamente incubadas com o inibidor por 30 minutos, ou ainda com a injeção das miotoxinas com posterior injeção do inibidor, 30 minutos após a aplicação das toxinas, no mesmo músculo.

A análise histopatológica dos músculos gastrocnêmicos dos camundongos mostraram que as miotoxinas BthTX-I, BthTX-II, PrTX-I e PrTX-III (Figura 37 A, D, G e J, respectivamente) são capazes de induzir severo dano às fibras musculares dos animais, recrutando um grande número de infiltrados leucocitários, além de formar um intenso acúmulo de líquido intercelular, demonstrando edema local.

Nessa mesma análise, pode ser observado também, que quando essas diferentes miotoxinas são previamente incubadas com rBaltMIP por 30 minutos, ocorre uma diminuição do dano local (Figura 37 B, E, H e K), representado pela manutenção da integridade das fibras musculares e principalmente pela drástica diminuição do número de infiltrados leucocitários. É interessante observar, que aparentemente, rBaltMIP obteve maior sucesso em proteger (ou diminuir o dano de) os músculos quando submetido à atividade com as Lys49 PLA₂s-símile (assim como para a atividade de medição dos níveis de CK no plasma) (Figura 37 B e H). É interessante ressaltar que esta constatação é apenas com base na visualização da integridade das fibras do músculo gastrocnêmio e no número de infiltrados, nenhum experimento foi realizado para mensurar este efeito nesta análise.

Além disso, quando injetada as miotoxinas e após 30 minutos injetado rBaltMIP na proporção 1:1 (M:M) no mesmo músculo, também observa-se uma melhora na integridade muscular e diminuição do infiltrado leucocitário (Figura 37 C, F, I e L), comparada ao controle (Figura 37 A, D, G e J), principalmente quando observado a inibição das Lys49 PLA₂s símile BthTX-I e PrTX-I.

Figura 37: Análise histopatológica do músculo gastrocnêmio de camundongos. Microscopia de luz de cortes advindos do músculo gastrocnêmio de camundongos que foram injetados com: **(A)** BthTX-I (50µg), **(B)** BthTX-I (50µg) previamente (30 minutos) incubado com rBaltMIP, na proporção 1:1 (M:M), **(C)** BthTX-I (50µg) com posterior injeção (30 minutos) de rBaltMIP, na proporção 1:1 (M:M), **(D)** BthTX-II (50µg), **(E)** BthTX-II (50µg) previamente (30 minutos) incubado com rBaltMIP, na proporção 1:1 (M:M), **(F)** BthTX-II (50µg) com posterior injeção (30 minutos) de rBaltMIP, na proporção 1:1 (M:M), **(G)** PrTX-I (50µg), **(H)** PrTX-I (50µg) previamente (30 minutos) incubado com rBaltMIP, na proporção 1:1 (M:M), **(I)** PrTX-I (50µg) com posterior injeção (30 minutos) de rBaltMIP, na proporção 1:1 (M:M), **(J)** PrTX-III (50µg), **(K)** PrTX-I (50µg) previamente (30 minutos) incubado com rBaltMIP, na proporção 1:1 (M:M), **(L)** PrTX-I (50µg) com posterior injeção (30 minutos) de rBaltMIP, na proporção 1:1 (M:M), **(M)** Músculo injetado com PBS (Controle negativo) **(N)** Músculo injetado com PBS, sofrendo posterior (30 minutos) injeção com PBS(Controle negativo).

4.7 Análise de docking molecular e mapeamento da possível região de interação α BaltMIP/Lys49 PLA₂s-símile.

Os programas utilizados para a realização do *docking* macromolecular entre a miotoxina PLA₂ símile BthTX-I e o inibidor de miotoxina α BaltMIP foram o Z-Dock 3.0.2 (<http://zdock.umassmed.edu/>) e o AutoDock tools 1.5.4 (ADT) (<http://autodock.scripps.edu/>). Usando o ADT, foram retiradas as águas de hidratação e ligantes presentes nas estruturas do inibidor e da miotoxina.

É interessante ressaltar que, o estudo de *docking* macromolecular foi realizado utilizando a estrutura quaternária trimérica de α BaltMIP, estrutura esta conhecida como sendo sua conformação em solução, além disso foi também utilizada para este estudo a estrutura quaternária dimérica das miotoxinas Lys49, já que este estado é fundamental para a atividade dessas moléculas. Para esse estudo, foi considerado somente a estrutura quaternária das PLA₂s homólogas denominadas “dímero alternativo”, já que essa é a forma mais encontrada na natureza. Inicialmente foi realizado um estudo na literatura sobre os possíveis sítios miotóxicos de BthTX-I e possíveis sítios inibitórios de α BaltMIP. Posteriormente, foi realizado o *docking* macromolecular entre essas macromoléculas.

Os resultados do *docking* (Figura 38) mostraram que as interações mais favoráveis entre o alfa inibidor plasmático α BaltMIP com a PLA₂-símile BthTX-I e suas possíveis áreas de *docking* se situam na região do sítio de reconhecimento de carboidrato (CRD) de α BaltMIP, sendo esta, a região considerada no presente trabalho como o possível sítio inibitório desses alfa inibidores. Além disso, a região de BthTX-I que pode se ligar à α BaltMIP representa uma grande área da molécula, compreendendo inclusive o sítio C-terminal desta proteína.

Os resíduos de aminoácidos que podem interagir nesse acoplamento inibidor/miotoxina nas Lys49 PLA₂s-símile seriam os seguintes: os resíduos de Lys20 de ambas as cadeias da miotoxina, os quais poderiam, de acordo com os nossos estudos, interagir com o resíduo de Asp134 do alfa inibidor. Além disso, os resíduos Arg118 ou Lys 115 das PLA₂s-símile, que poderiam sofrer ligações com Glu58 dos inibidores, ademais, o resíduo Arg118 das Lys49, os quais tem

proximidade suficiente com Asp135 para haver interação entre ambos. Também, o resíduo da miotoxina Lys16 possui grande proximidade com Glu53 do inibidor, podendo sofrer interação. Além disso, o resíduo de aminoácido Lys116 das PLA₂s símile parece sofrer interação com o resíduo Glu65 dos alfa inibidores. Outro ponto interessante é a possível ligação de H que a Tyr119 parece fazer com Asp134. Outros aminoácidos dessas miotoxinas parecem também interagir com resíduos do inibidor, como: Lys7 com Glu93; Lys78 com asp134 ou Asp135 e Asp79 parece formar uma ponte de H com Asp136 (Figura 39).

É interessante apontar que, a conformação de ligação que aparece na figura 41 parece favorecer a ligação inibidor/ligante, já que várias posições de ligação dímero/trímero parecem possíveis, principalmente devido às múltiplas combinações possíveis, facilitada pela proporção 3:2 (inibidor: PLA₂). Além disso, um fator importante a ser apontado é que a metodologia de *docking*, usualmente não considera a flexibilidade das macromoléculas, não considerando portanto uma melhor orientação espacial das moléculas após a ancoragem.

O objetivo principal desta técnica no presente trabalho foi verificar as melhores conformações viáveis entre as PLA₂s homólogas Lys49 e os alfa inibidores provenientes de plasma de serpentes e especular um provável mecanismo de interação. Estudos mais específicos, como a co-cristalização entre essas duas macromoléculas e/ou mutagênese sítio-dirigidas podem trazer melhores esclarecimentos e confirmar ou não as hipóteses levantadas no presente trabalho.

Figura 38: Estruturas da BthTX-I (superior, em vermelho) e do α BaltMIP (inferior, em azul), obtida pelo estudo de *docking* macromolecular pelo programa Zdock (<http://zdock.umassmed.edu/>).

Figura 39: Detalhe dos resíduos que podem sofrer interações de acordo com o estudo de *docking* macromolecular pelo programa Zdock (<http://zdock.umassmed.edu/>). De acordo com esses estudos os resíduos da miotoxina que podem sofrer interações com os resíduos do α BaltMIP são, respectivamente **(A)** Lys115 com Glu58; **(B)** Lys116 com Glu65; **(C)** Arg118 com Asp134; **(D)** Lys20 com Asp135; **(E)** Tyr119 com Asp134 e **(F)** Lys115 com Tyr95.

5. DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das Fosfolipases A₂ das peçonhas de *B. jararacussu*, *B. pirajai* e *C. d. terrificus*

Inicialmente, é interessante ilustrar que, para o estudo de neutralização das atividades fosfolipásicas, anticoagulantes, miotóxicas e citotóxicas foram utilizadas as seguintes PLA₂s Asp49 e PLA₂s-símile Lys49: BthTX-I, BthTX-II, PrTX-I, PrTX-III e CB, purificadas segundo Soares e colaboradores (2000), Mancuso et al. (1995), Andrião-Escarso et al. (2002) (com modificações), Faure et al. (1994), respectivamente.

Estas toxinas foram escolhidas para serem utilizadas no presente trabalho devido ao alto grau de conhecimento das mesmas, pois são proteínas extremamente conhecidas em relação às suas atividades biológicas e características estruturais.

A crotoxina foi isolada da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*. Esta enzima é um complexo heterodimérico formado por dois componentes: crotoxina A (componente ácido - CA ou crotapotina) e a crotoxina B (componente básico - CB ou Asp49-PLA₂ básica). A subunidade crotapotina não apresenta atividade tóxica ou enzimática, atuando como uma chaperona para a CB, inibindo a sua atividade enzimática e neurotóxica até que o complexo crotoxina atinja o local de atuação do componente básico. Estas duas subunidades agem de forma sinérgica, formando um complexo tetramérico, o qual aparenta estar correlacionado com o desencadeamento da atividade neurotóxica exercida por esta toxina (MARCHI-SALVADOR et al., 2008). A crotoxina B bloqueia a transmissão neuromuscular inibindo a liberação de acetilcolina, causando paralisia motora e respiratória. Além disso, CB apresenta atividade catalítica sobre fosfolipídeos, além de atividade anticoagulante. As CBs são Asp49-PLA₂ básicas compostas por 122 resíduos de aminoácidos, com Mr de 14.100 e possuem estrutura terciária bem conhecida (MARCHI-SALVADOR et al., 2008; SALVADOR et al., 2009). Geralmente, os PLIs purificados a partir do plasma de serpentes apresentam baixa inibição da atividade dessa toxina (SOARES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008).

As fosfolipases A₂ denominadas bothropstoxinas I e II (BthTX-I e BthTX-II) e BthA-I-PLA₂ foram isoladas da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu* conforme descrito por Homs-Brandeburgo et al. (1988) e Andrião-Escarso et al. (2000), respectivamente. A BthTX-I é uma proteína básica, Lys49-PLA₂, composta por 121 resíduos de aminoácidos (pI 8,2; Mr 13.600). Embora esta proteína não apresente atividade catalítica detectável, a BthTX-I é uma das responsáveis pela atividade miotóxica causada pela peçonha de *B. jararacussu* sendo, também, citotóxica, indutora de edema, capaz de bloquear a transmissão neuromuscular, desencadeadora de hiperalgesia e é letal (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000). A BthTX-II é uma Asp49-PLA₂ básica e miotóxica, composta por 122 resíduos de aminoácidos (pI 8,5; Mr 13.900), porém apresenta atividade catalítica sobre fosfolipídeos. A BthTX-II apresenta considerável atividade miotóxica, citotóxica, anticoagulante, hemolítica, indução de agregação plaquetária e é letal (BONFIM et al., 2001).

A enzima BthA-I-PLA₂ é uma fosfolipase A₂ ácida, que possui 122 resíduos de aminoácidos, massa molecular relativa de 14.000 e pI em torno de 4,5. Estudos de caracterização mostraram que esta proteína apresenta uma alta atividade catalítica, além de, efeito hipotensivo, indução de edema e inibição de agregação plaquetária, porém, não foram detectadas, atividades miotóxica, neurotóxica e citotóxica (Andrião-Escarso et al., 2002).

As proteínas Piratoxina-I e III (PrTX-I e PrTX-III) foram isoladas da peçonha da serpente *Bothrops pirajai* conforme descrito por Andrião-Escarso et al. (2002) com modificações. A PrTX-I é uma Lys49-PLA₂ básica, miotóxica, composta por 121 resíduos de aminoácidos (pI 8,9, Mr 13.600). Como toda enzima Lys49 não apresenta atividade catalítica sobre fosfolipídeos, mas, apresenta alta atividade miotóxica (MANCUSO et al., 1995). Em contraste, a PrTX-III é uma enzima Asp49-PLA₂, também básica (pI 8,5, Mr 13.800), que apresenta atividade PLA₂, além de atividade miotóxica e coagulante (TOYAMA et al., 1999).

5.2 Isolamento do inibidor de Fosfolipases A₂ do tipo alfa (α BaltMIP) do plasma da serpente *Bothrops alternatus* e caracterização bioquímica parcial

No presente trabalho, um inibidor de fosfolipase A₂ miotóxica do tipo alfa (α BaltMIP) foi purificado do plasma da serpente *B. alternatus* por meio de cromatografia por afinidade, utilizando uma PLA₂-símile Lys49 (BthTX-I) acoplada em resina Sepharose 4B-CNBr ativada. Posteriormente, o inibidor isolado, chamado de α BaltMIP, foi submetido à uma cromatografia líquida de alta performance (CLAE/HPLC) e à eletroforese em presença do agente redutor β -mercaptoetanol, com o intuito de confirmar o grau de pureza da proteína. O inibidor isolado apresentou-se como uma proteína altamente pura, tanto em HPLC quanto em SDS-PAGE, consistindo em uma cadeia polipeptídica simples com massa molecular relativa de 24.000.

Vários α -PLIs foram purificados de uma variedade de outras serpentes, como, por exemplo, o PLI purificado do plasma da serpente *Trimeresurus flavoviridis*, através de uma combinação de coluna de gel filtração Sephadex G-200, troca iônica DEAE-cellulose e Blue-Sepharose CL-6B (KOGAKI et al., 1989). O inibidor purificado apresentou-se como uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 100.000, o qual consiste em 4 subunidades monoméricas não homólogas de aproximadamente 20.000 - 24.000. Neste trabalho, foi testada a capacidade desse inibidor de interagir com as fosfolipases A₂ das peçonhas de *T. flavoviridis* e *Agkistrodon halys blomhoffii*, além da enzima pancreática suína e da fosfolipase C de *Bacillus cereus*. Todos esses testes foram realizados na presença e ausência Ca²⁺. Segundo Kogaki e colaboradores (1989) este inibidor apresentou especificidade pela PLA₂ de *T. flavoviridis*, além de uma atividade inibitória independente de íons Ca²⁺.

Posteriormente, Ohkura e colaboradores (1993), purificaram um alfa inibidor do plasma da serpente *Agkistrodon blomhoffii siniticus*, através de um método semelhante ao anterior. Neste caso, a purificação deste PLI foi realizada por cromatografias sequenciais em colunas Sephadex G-200, Mono Q e Blue-Sepharose CL-6B. O PLI purificado mostrou-se como uma glicoproteína de massa molecular aparente de 75.000 para o trímero e 24.000 para o monômero. O PLI de

A. blomhoffii siniticus se diferenciou do PLI proveniente de *T. flavoviridis* pelo fato de ser um homodímero, apesar da grande semelhança em relação às propriedades inibitórias. Outros α PLIs foram purificados a partir dos plasmas das serpentes *Atropoides nummifer* (QUIRÓS et al., 2007) e *Protobothrops flavoviridis* (SHIMADA et al., 2008), sendo todos glicoproteínas ácidas com tendência à formação de polímeros a partir de monômeros, com peso molecular entre 20.000 - 24.000.

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

Soares e colaboradores (2003) purificaram uma proteína que neutraliza a atividade enzimática, tóxica e farmacológica de uma variedade de toxinas (ácidas ou básicas) de diferentes peçonhas. Este inibidor, denominado de BmjMIP, foi isolado a partir do plasma da serpente *Bothrops moojeni*, por cromatografia de afinidade. BmjMIP apresentou características bioquímicas e estruturais semelhantes às já descritas para os α PLIs, além de ser estável em grande faixa de pH e temperatura. Por fim, Oliveira e colaboradores (2008) purificaram um α PLI do plasma da serpente *Bothrops jararacussu* com características e atividades semelhantes ao BmjMIP.

O sequenciamento N-terminal de α BaltMIP, realizado em sequenciador automático, por meio da degradação de Edman, mostrou a sequência HEQDPDGKLLNSLIDALMHLQREFAKLRGAF, correspondente aos primeiros 31

resíduos de aminoácidos da região N-terminal. A comparação da região N-terminal do α BaltMIP mostrou alta similaridade com as sequências de outros inibidores, apresentando até 90% de identidade com PLIs de serpentes do gênero *Bothrops* e até 80% de similaridade com inibidores de outros gêneros.

A característica mais comum entre os α PLIs é a presença de um domínio homólogo ao domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) Ca^{2+} -dependente (C-type) (LIZANO et al., 2003). Em contraste com a característica de lectinas do tipo C, entretanto, a ligação do CRD dos α PLIs à sua respectiva PLA_2 ligante é Ca^{2+} -independente (OHKURA et al., 1993).

Nobuhisa e colaboradores (1998) e Okumura e colaboradores (2005) propuseram que a região CRD-símile dos α PLI pode ser necessária para a ligação PLA_2 /PLI, demonstrando a alta relevância dessa região no mecanismo de ação dessas proteínas. Entretanto, a natureza molecular da interação entre a região CRD e as PLA_2 s ainda não é conhecida (LIZANO et al., 2003) e esforços na elucidação da estrutura dos α PLIs e seus respectivos complexos estão sendo realizados.

Na tentativa de colaborar com o estudo do conteúdo de estruturas secundárias desses inibidores e dos complexos inibidor/ PLA_2 s, foi realizado o dicróismo circular (DC) das miotoxinas Lys49 (BthTX-I) e Asp49 (BthTX-II e CB), do inibidor α BaltMIP e de seus respectivos complexos. Diferentemente dos estudos realizados por Soares et al. (2003) e Oliveira et al. (2008) os espectros de DC e os dados de deconvolução dos complexos PLA_2 / α BaltMIP são consideravelmente diferentes daqueles correspondentes às proteínas individuais, indicando uma estrutura mais compacta durante a formação do complexo.

5.3 Atividades de neutralização das PLA_2 s

O α BaltMIP foi mais eficaz na inibição das atividades fosfolipásica e anticoagulante da BthTX-II e PrTX-III, mostrando-se menos efetivo contra as atividades induzidas pela crotoxina B e BthA-I- PLA_2 (Fig. 5). O α BaltMIP inibiu aproximadamente 38% e 41% da atividade enzimática de BthTX-II e PrTX-III, respectivamente, atingindo a inibição máxima na proporção de 1:1 PLA_2 /PLI

(mol/mol). Na literatura tem sido relatado que α PLIs isolados de serpentes da subfamília *crotalinae* provenientes da América são mais seletivos em relação às PLA₂s básicas (PERALES; DOMONT, 2002; OLIVEIRA et al., 2008), enquanto que os provenientes de espécies de serpentes asiáticas preferencialmente interagem com PLA₂s ácidas (INOUE et al., 1997). No entanto, nenhuma diferença evidente nas sequências de aminoácidos dos α PLIs poderia ser atribuída para justificar essa variação nos perfis inibitórios (LIZANO et al., 2000). Quirós e colaboradores (2007) propuseram que uma especialização intra-específica dos inibidores de PLA₂s particularmente co-evoluem contra sua própria peçonha. Esta hipótese parece ser uma explicação mais razoável do que uma subdivisão inicial da especificidade desses inibidores em serpentes crotalineas asiáticas e americanas.

Conforme mostra a Figura 6 o α BaltMIP também apresentou maior inibição da atividade anticoagulante para BthTX-II e PrTX-III. Na literatura é possível constatar que algumas PLA₂s provenientes de peçonhas de serpentes possuem atividade anticoagulante (OUYANG et al., 1992; HIGUCHI et al., 2006). Alguns autores sugerem que a capacidade dessas PLA₂s de se ligarem a fosfolípidos que compõem a membrana plasmática indica que essas enzimas provenientes de peçonhas de serpentes possam inibir a coagulação do sangue através da destruição de fosfolípidos pró-coagulantes, sendo a atividade catalítica das PLA₂s diretamente responsável por seus efeitos anticoagulantes (KINI, 2003; CHIOATO; WARD, 2003). Nossos resultados corroboram esta hipótese, uma vez que as atividades anticoagulante e catalítica mostraram-se similares.

Além disso, as atividades de neutralização da citotoxicidade e mitotoxicidade das PLA₂s Asp49 e PLA₂s-símile Lys49 foram realizadas, demonstrando que o α BaltMIP apresenta certa especificidade pelas toxinas Lys49. Alguns estudos envolvendo as Lys49-PLA₂s-símbles têm demonstrado que a região C-terminal está relacionada aos efeitos citotóxicos e bactericida destas proteínas (COSTA et al., 2008; LOMONTE et al., 2010).

Segundo alguns autores, o principal domínio estrutural responsável pelo efeito tóxico, principalmente citotóxico, em PLA₂s-símbles Lys49 é a região C-terminal (LOMONTE et al., 2010). Esta hipótese foi corroborada com os trabalhos de Núñez et al. (2001) e Lomonte et al. (2003), os quais submeteram peptídeos sintéticos que

correspondem à região C-terminal (aminoácidos 115-129) a testes de citotoxicidade, concluindo que essa região foi a responsável pela atividade tóxica de algumas PLA₂s miotóxicas. Esta região combina resíduos de aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos responsáveis pelo mecanismo de dano de membranas celulares. Os resíduos catiônicos podem interagir com grupos aniônicos de um sítio receptor nos fosfolípídeos da membrana, provavelmente, negativamente carregados (LOMONTE et al., 2003), enquanto que os resíduos hidrofóbicos, especialmente os aromáticos, podem interagir e, eventualmente, penetrar na bicamada fosfolipídica, resultando em sua desestabilização (NÚÑEZ et al., 2001).

É interessante ressaltar que, o fato de um único peptídeo reproduzir algumas atividades tóxicas da molécula de origem não impede a existência de outras regiões da molécula que podem participar ou complementar a ação tóxica local dessas proteínas (LOMONTE et al., 2003).

Em contraste com esta hipótese, os peptídeos da região C-terminal de algumas PLA₂s Asp49 miotóxicas não mostraram nenhuma atividade de dano direto à membrana, sugerindo que o mecanismo de toxicidade exercido por estas proteínas provavelmente envolve sua atividade catalítica, como um passo importante, diferente da utilizada pelas PLA₂s-símbles Lys49 miotóxicas (NÚÑEZ et al., 2001).

Segundo essa hipótese, alguns estudos têm sugerido que PLA₂s Asp49 miotóxicas podem induzir dano muscular por afetar a integridade das membranas plasmáticas (FULY et al., 2003; SANTOS-FILHO et al., 2008). As membranas são formadas por diferentes tipos de fosfolípídeos, principalmente fosfatidilcolina, que pode ser hidrolisado por PLA₂s Asp49 produzindo ácidos graxos livres e lisofosfolípídeos, causando dano celular (SANTOS-FILHO et al., 2008).

A fim de trazer alguma luz a esta discussão, a atividade citotóxica foi realizada em linhagens celulares de mioblastos de camundongos (células C2C12), testando BthTX-I (uma miotoxina Lys49), pepBthTX-I (um peptídeo sintético derivado do C-terminal da BthTX-I) e α BaltMIP. A proteína BthTX-I nativa apresentou uma alta citotoxicidade nas células C2C12, a qual foi considerada como 100%. O peptídeo sintético pepBthTX-I também mostrou atividade citotóxica sobre a linhagem celular

avaliada (cerca de 76% da proteína nativa). Quando α BaltMIP foi previamente incubado com BthTX-I e pepBthTX-I, uma notável redução em sua atividade citotóxica foi observada (cerca de 40% da atividade de BthTX-I/ α BaltMIP e 25% para pepBthTX-I/ α BaltMIP, na relação molar de 1:1).

A região C-terminal da PLA₂-símiles Lys49 possivelmente é responsável pelo efeito citotóxico destas enzimas (NÚÑEZ et al., 2001; LOMONTE et al. 2003; COSTA et al., 2008), o que também pudemos observar no presente trabalho. No entanto, a participação de outras regiões da proteína em seu mecanismo tóxico, não pode ser excluída. A interação entre o inibidor e proteínas (por exemplo, α BaltMIP/BthTX-I) parece ocorrer de várias maneiras e não apenas na região C-terminal, uma vez que a atividade tóxica não foi abolida totalmente quando foi incubado o inibidor com peptídeos sintéticos da região C-terminal de BthTX-I.

O α BaltMIP foi capaz de inibir a atividade miotóxica/citotóxica tanto de PLA₂s Lys49 quanto de Asp49, sugerindo que podem haver várias formas de inibição. Soares e colaboradores (2003) sugeriram pelo menos dois mecanismos através dos quais, α PLIs poderiam neutralizar PLA₂s: (1) α PLIs poderiam se ligar em domínios PLA₂ através da sua região CRD e bloquear, através de impedimento físico, a interação entre o domínio citotóxico e a membrana celular ou (2) α PLIs poderiam se vincular diretamente a outros domínios das miotoxinas, evitando o contato direto com a membrana.

5.4 Clonagem, determinação da sequência, estrutura terciária e estudos de dinâmica molecular de α BaltMIP

O termo clonagem significa a produção de um segmento de DNA, grupo de células ou de indivíduos geneticamente idênticos, por meio de reprodução assexuada, a partir de um ancestral comum. Quando aplicado ao DNA, a clonagem é entendida como a inserção de uma sequência de DNA em uma célula de tal modo que este seja replicado e conservado (<http://www.faunativa.com.br/glossário>).

A clonagem molecular é fundamentada na construção de um DNA recombinante, envolvendo o preparo do DNA de interesse, chamado inserto, e a

ligação do mesmo em uma molécula chamada vetor. Esse vetor normalmente é um plasmídeo (SELISTRE de ARAÚJO; FERREIRA de SOUZA, 2007).

Atualmente, o método mais utilizado para a clonagem de proteínas é a extração do RNA total e posterior obtenção do cDNA a partir do mRNA, por meio de técnicas de PCR. A fonte mais importante para a extração dos RNAs para o estudo de toxinas ofídicas é a glândula da peçonha da serpente, a qual se situa atrás dos olhos. Contudo, para o estudo de proteínas plasmáticas, dentre elas os inibidores de miotoxinas, a fonte primordial de RNA é o fígado da serpente, já que esse órgão é o principal produtor de proteínas séricas.

Para o processo de clonagem, inicialmente, foi purificado o mRNA e posteriormente foi obtido um cDNA a partir da fita de mRNA molde. É interessante ressaltar que todas as reações de PCR foram realizadas com oligonucleotídeos específicos concebidos com base na codificação de nucleotídeos de sequência para os α PLIs de *T. flavoviridis* previamente descritos (NOBUHISA et al., 1997).

A comparação da sequência de aminoácidos do α BaltMIP com outros α PLIs provenientes de serpentes - incluindo o modelo teórico de GbPLI α (um α PLI proveniente da serpente *Gloydius brevicaudus*) (OKUMURA et al., 2005) - e a proteína surfactante SP-D proveniente dos mamíferos *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens* (HAKANSSON et al., 1999), mostra uma inserção de resíduos de aminoácidos nas proteínas dos mamíferos na região correspondente aos resíduos 97-109 (correspondente a região entre os resíduos 294-306 de acordo com a numeração da sequência da proteína humana) (Fig. 9).

Curiosamente, uma comparação estrutural entre o modelo final MD de α BaltMIP e a estrutura cristalográfica do SP-D de *Homo sapiens* indica que essa inserção corresponde a um *loop* onde os resíduos Asp297 e Glu301 estão inseridos, os quais estão envolvidos na coordenação de dois íons Ca^{2+} . Um desses íons Ca^{2+} também é responsável pela coordenação de um importante elemento estrutural (um *loop* e outro íon Ca^{2+}) envolvidos na ligação com carboidratos (SHRIVE et al., 2006). Portanto, a ausência desse "*loop* ligante de Ca^{2+} " no modelo teórico α BaltMIP parece reforçar a hipótese de que α PLIs provenientes de plasma de serpentes não

se ligam a carboidratos e apresentam uma atividade inibitória independente de Ca^{2+} , como observado anteriormente por Okumura e colaboradores (2005).

Nesse mesmo trabalho de Okumura e colaboradores (2005) foi também afirmado que a região do “pescoço” α -helicoidal dos α PLIs provenientes de plasma de serpentes é a região responsável por levar a trimerização destas proteínas, resultando na formação de um poro central responsável pela ligação e inibição da PLA_2 .

Para reforçar esta hipótese, foi realizado o experimento de espalhamento dinâmico de luz (DLS) com o α BaltMIP nativo, para observação de uma possível oligomerização para esta proteína e, eventualmente, para outros α PLIs oriundos de serpentes. Os dados de DLS mostraram que α BaltMIP apresenta um estreito tamanho unimodal de distribuição a 4°C (277 K) e 10°C (283 K), com, respectivamente, valores de polidispersidade de 3,3% e 13,4% e raios hidrodinâmico (R_H) de 3,4 nm e 3,6 nm. Notavelmente, os valores de R_H dos centros de espalhamento formados nas condições testadas são consideravelmente distintos dos valores de rotação do raio (~2,0 - 2,5 nm), apresentado pelo modelo α BaltMIP durante a simulação MD (BERENDSEN et al., 1995; LINDAHL et al., 2001).

Segundo alguns autores α PLIs provenientes do plasma de serpentes são encontrados em solução como oligômeros, sendo que, o mais comum é a presença de trímeros desses inibidores (LIZANO et al., 2003; SOARES et al., 2003; OKUMURA et al., 2003; 2005; QUIRÓS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; NISHIDA et al., 2010), sendo assim, um oligômero trimérico foi montado e submetido a um anelamento simulado (JONES, et al., 1990; BRÜNGER, et al., 1998), a fim de verificar, especificamente, se α BaltMIP também poderia trimerizar como outros α PLIs oriundos de plasma de serpentes, o que mostrou-se favorável na análise *in silico* (Fig. 10).

O mecanismo de ação desses α PLIs ainda é desconhecido, entretanto, alguns autores sugerem que o mecanismo de ação desses inibidores provavelmente está relacionado com a região DRC, o qual reconhece e liga-se a enzima, deste modo impedindo a atividade tóxica das PLA_2 s na membrana celular (NICOLAS; LAMBEAU; LAZDUNSKI, 1995; LIZANO et al., 1997; VALENTIN; LAMBEAU, 2000;

OLIVEIRA et al., 2008). Entretanto, outros autores sugerem que a região N-terminal da molécula, principalmente a região encontrada entre os resíduos de aminoácidos 13-36 é o sítio responsável pela atividade inibitória dessas moléculas (OKUMURA et al., 2005; NISHIDA et al., 2010).

Para comprovar algumas dessas hipóteses, alguns autores realizaram análise de deleção parcial de alguns resíduos de aminoácidos nessas moléculas. Nobuhisa e colaboradores (1998) mapearam a interação entre um α PLI e uma PLA₂ ácida de *T. flavoviridis* na região CRD, e esta capacidade de ligação foi ainda mais restrita à região C-terminal entre os resíduos 136-147. Segundo alguns autores, nesta região, dois tripeptídeos hidrofóbicos (NOBUHISA et al., 1998) e o resíduo Y144 (OKUMURA et al., 2005) mostraram-se envolvidos na interação PLI/PLA₂s (QUIRÓS et al., 2007).

Além disso, outros autores sugerem diferentes regiões responsáveis pela atividade inibitória dessas proteínas, por exemplo, Okumura e colaboradores (2005), os quais realizaram estudos com um α PLI de *A. blumhoffii siniticus* e uma proteína com estrutura e sequencia semelhantes à um α PLI, contudo sem atividade inibitória sobre PLA₂s, chamado então de PLI-símile. Com base em quimeras entre as duas proteínas citadas anteriormente, bem como mutagênese sítio-dirigida Okumura et al. (2005) e Nishida et al., (2010), em trabalhos complementares, propuseram que α PLIs formam uma estrutura trimérica, em que a região N-terminal posicionada anteriormente ao CRD é a responsável pela trimerização, e subsequentemente pela formação de um poro central, que seria a estrutura responsável pela ligação com as PLA₂s.

Como se pode notar, o mecanismo de ação desses inibidores e a região responsável por sua inibição ainda não está totalmente elucidado na literatura, sendo necessário maiores estudos a respeito dessas macromoléculas e de suas interações com as PLA₂s.

5.5 Expressão e caracterização de rBaltMIP

A expressão de proteínas através de técnicas de biologia celular está sendo um recurso bastante utilizado atualmente, a fim de se obter em maior quantidade e de forma ativa, biomoléculas aplicáveis em diversas áreas da saúde e da pesquisa.

Para o presente trabalho, foi selecionado, como sistemas de expressão leveduras *Pichia pastoris*. Entre os sistemas eucariontes mais utilizados estão as leveduras, as quais tem a vantagem tanto de serem microorganismos, portanto, de fácil manipulação, quanto serem organismos eucariontes, os quais podem ser capazes de promover modificações pós-traducionais, as quais incluem formação de pontes dissulfeto, adição de lipídeos e N- e O- glicosilação (CREGG et al., 2000; CEREGHINO & CREGG, 2000; SELISTRE de ARAÚJO; FERREIRA de SOUZA, 2007). Além disso, as leveduras têm outras vantagens sobre sistemas procariontes, como a ausência de necessidade de se renovar quimicamente a proteína de interesse, diminuindo assim a possibilidade de erros na expressão das macromoléculas.

De acordo com Selistre de Araújo e Ferreira de Souza (2007) o uso da levedura *Pichia pastoris* é importante quando se objetiva moléculas secretadas e em grande quantidade. Além disso, essas leveduras são capazes de crescerem em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono, além de apresentar o promotor de transcrição de genes heterólogos AOX1.

No presente trabalho, o vetor utilizado para a transformação de células de *P. pastoris* foi o plasmídeo pPICZαA. Este plasmídeo contém o gene *Sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (HIGGINS & CREGG., 1998; CEREGHINO & CREGG, 2000) que confere resistência à zeocina, permitindo a seleção tanto de transformantes de *E. coli* na fase de amplificação do vetor quanto de *P. pastoris* na etapa de expressão de proteínas.

Além disso, uma grande vantagem do vetor utilizado é a presença de um fragmento que codifica um peptídeo sinal de *S. cerevisiae* composto por 89 aminoácidos (α -factor) (LAROCHÉ et al., 1994; CLARE et al., 1991; HIGGINS & CREGG., 1998; CEREGHINO & CREGG, 2000; CREGG et al., 2000), localizado imediatamente após o promotor AOX1, permitindo o direcionamento da proteína

recombinante através da via secretória da levedura. Este vetor contém também múltiplos sítios de restrição para inserção de genes heterólogos seguido de uma cauda de seis resíduos de histidina que facilita a purificação da proteína heteróloga por cromatografia de afinidade, assim como utilizado no presente trabalho.

Após a purificação do inibidor produzido através da expressão heteróloga, chamado rBaltMIP, foi realizado a caracterização de suas atividades inibitórias. O inibidores expresso e nativo foram capazes de inibir em parte, a atividade catalítica das fosfolipases Asp49, sendo que na proporção molar de 1:3 (toxina:inibidor) houve uma maior porcentagem de inibição (aproximadamente 60% de inibição sobre BthTX-II e 40% sobre PrTX-III) (Fig. 33).

Como dito anteriormente, alguns autores afirmam que α PLIs são capazes de trimerizar em solução (LIZANO et al., 2003; SOARES et al., 2003; OKUMURA et al., 2003; 2005; QUIRÓS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; NISHIDA et al., 2010) e de acordo com Nishida e colaboradores (2010) essa trimerização é fundamental para a atividade inibitória dos α PLIs frente às PLA₂s, o que pode reforçar essa maior porcentagem de inibição quando utilizada a proporção molar 3:1 (inibidor:PLA₂).

É sabido que em envenenamentos, principalmente por peçonhas botrópicas, ocorre uma alta indução da liberação da proteína creatina cinase presente nos músculos, grande parte devido à ação direta de miotoxinas sobre as células musculares (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995). O inibidor expresso rBaltMIP foi capaz de inibir a miotoxicidade induzida pelas miotoxinas Asp49 PLA₂s e Lys 49 PLA₂s-símile, principalmente BthTX-I e PrTX-I (Fig. 34).

Além disso, foi avaliado o real potencial terapêutico do inibidor de miotoxinas rBaltMIP no tratamento de envenenamentos. Para tanto, foi testada a possibilidade de inibição da atividade miotóxica sem a pré-incubação do inibidor com as possíveis proteínas alvo. Com isso, o rBaltMIP apresentou interessante potencial na utilização desses inibidores plasmáticos na terapêutica de envenenamentos, com a inibição da atividade miotóxica das miotoxinas presentes nas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* com aplicação do inibidor após 30 minutos da inoculação das toxinas.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2010) as imunoglobulinas presentes nos antivenenos específicos são o único tratamento para o

envenenamento por picadas de serpentes. Eles são produzidos por fracionamento do plasma normalmente obtidos a partir de grandes animais (normalmente cavalos) hiper-imunizados contra as respectivas peçonhas. Ainda, segundo a OMS (2010), quando injetado em um paciente, vítima de envenenamento, o soro poderá neutralizar qualquer das peçonhas utilizadas na sua produção e, em alguns casos também neutralizar peçonhas de espécies estreitamente relacionadas.

O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde (2005) para os acidentes ofídicos é a administração endovenosa de soro antiofídico, sendo que, de acordo com a gravidade do envenenamento o número de ampolas do antiveneno administradas, pode variar.

É sabido que algumas enzimas e toxinas, como por exemplo, PLA₂s, neurotoxinas e miotoxinas PLA₂s-símile apesar de serem extremamente tóxicas, são pouco imunogênicas. KULKEAW e colaboradores (2007) em um estudo sobre o Proteoma e o imunoma da peçonha da serpente *Naja kaouthia* (*Thai cobra*) observaram em *Western blot*, uma fraca interação entre o soro antiofídico comercial específico para essa serpente e as miotoxinas dessa peçonha. Segundo esse estudo, pode ser devido à elevada toxicidade, mas fraca imunogenicidade dos componentes menores que não provocam respostas de anticorpos nos cavalos imunizados. Segundo o mesmo estudo, cada dose tolerável da peçonha para a imunização do cavalo pode conter uma quantidade imunogênica das miotoxinas muito pequena, contudo, esses componentes da peçonha mesmo em pequenas doses, podem ser extremamente tóxicas, o que se leva a crer que a dose tóxica desses componentes é muito maior do que a dose imunogênica.

5.6 Docking Macromolecular

Na tentativa de elucidar o mecanismo de inibição dos alfa inibidores de PLA₂s frente às miotoxinas e conseqüentemente das próprias miotoxinas, foi realizado o docking macromolecular entre essas moléculas.

Inicialmente, é interessante ressaltar, que a miotoxicidade nos envenenamentos não está relacionado somente com enzimas como as PLA₂, mas

também com as metaloproteases e as PLA₂s homólogas Lys49. Como o estudo da interação entre o α BaltMIP e as diferentes classes de miotoxinas seria um estudo muito amplo e complexo, é importante esclarecer que, para os estudos de docking macromolecular, foi levado em consideração apenas a interação do alfa inibidor, α BaltMIP, com as PLA₂s símile Lys49.

Além disso, outro fato relevante é que, o sítio responsável pela atividade miotóxica nas PLA₂s homólogas Lys49 ainda não está bem estabelecido e vários autores têm diferentes conceitos em relação à esses locais, por isso a busca para elucidar o mecanismo de ação das miotoxinas tem sido o objeto de esforços importantes, pois esta informação é relevante para a concepção de inibidores eficientes para estas toxinas.

Antes de se estudar os inibidores de miotoxinas Lys49 (dentre eles α BaltMIP), é importante entender a estrutura dessas toxinas. É interessante apontar que, nem mesmo a estrutura tridimensional dessas proteínas em solução é motivo de consenso entre os pesquisadores. O que se pode afirmar com certeza é que, as miotoxinas Lys49 são proteínas básicas e suas estruturas primárias possuem 120-122 resíduos de aminoácidos estabilizados por meio de sete pontes dissulfeto, altamente conservadas.

Além disso, um fato que todos os pesquisadores concordam é que, em solução, as PLA₂s-símeles Lys49 possuem estrutura quaternária, comportando-se como moléculas homodiméricas, onde os monômeros estão fortemente ligados por ligações covalentes (DOS SANTOS et al., 2009; LOMONTE; RANGEL, 2012).

Vários estudos de cristalização, já foram realizados com essas miotoxinas (ARNI et al., 1995; ARNI; WARD, 1996; DA SILVA GIOTTO et al., 1998; LEE et al., 2001; MAGRO et al., 2003; LIU et al., 2003; MURAKAMI et al., 2006; MARCHI-SALVADOR et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2009; DELATORRE et al., 2011), entretanto, existem duas diferentes vertentes para a conformação correta desses dímeros, uma hipótese é conhecida como “dímero convencional”, cristalizada por Arni and Ward (1996) e a outra proposição é conhecida como “dímero alternativo” e é a mais encontrada nas estruturas cristalográficas (DOS SANTOS et al., 2009; LOMONTE; RANGEL 2012) (Figura 40).

Figura 40: Diferentes modos de dimerização propostos para as miotoxinas Lys49 PLA₂s homólogas. **(A)** Modelo nomeado como dímero "alternativo" (DOS SANTOS et al., 2009) e **(B)** Modelo nomeado como dímero "convencional" (ARNI et al., 1995). As estruturas terciárias foram confeccionadas utilizando o programa Pymol. Figura baseada em dos Santos et al., 2009 e Lomonte e Rangel, 2012.

A partir daí, várias estratégias têm sido utilizadas para mapear os determinantes estruturais para a toxicidade das miotoxinas Lys49. Algumas abordagens têm sido essencialmente realizadas através de predições, por meio de análises *in silico*, enquanto que outras estão apoiadas experimentalmente, utilizando ensaios de toxicidade, com moléculas mutadas através de mutagênese sítio dirigidas e/ou peptídeos sintéticos. A figura 44 mostra esses quatro modelos propostos para o sítio miotóxico dessas proteínas.

Como podemos observar, três destes modelos coincidem na importância de um aglomerado de resíduos de aminoácidos localizados na região do C-terminal destas proteínas (Figura 41 A, C, D), enquanto que outro modelo propõe uma superfície alargada na molécula (Figura 41B), como sendo relevantes para a toxicidade.

O primeiro modelo, representado pela figura 45A foi proposto por Lomonte e colaboradores (1994), baseando-se em experimentos de miotoxicidade com peptídeos sintéticos da região entre os resíduos catiônicos e hidrofóbicos do segmento C-terminal das miotoxinas Lys49 correspondente entre a região dos resíduos de aminoácidos K115 e K129. O segundo modelo (Figura 41B), proposto por Selistre de Araújo et al. (1996), como citado anteriormente, foi baseado apenas em predições da estrutura dessas moléculas, e propõe que os resíduos de aminoácidos K7, E12, T13, K16, N17, K78, K80, K116 e K117 são os responsáveis pela atividade tóxica dessas enzimas.

O terceiro modelo apresentado, o qual foi elaborado por Chioato e colaboradores (2002), o qual foi baseado experimentalmente em mutações sítio dirigidas nas moléculas de miotoxinas (Figura 44E), sugere que a mesma porção catiônica e hidrofóbica da região C-terminal das miotoxinas, contudo menor que a sugerida por Lomonte et al. (1994), é a responsável por essa atividade (região encontrada entre os resíduos K117 e K122).

Por ultimo, um modelo mais recente foi proposto por dos Santos e colaboradores (2009) (Figura 41D), o qual foi baseado em estudos cristalográficos, apresenta uma mudança significativa das anteriores, predizendo um papel importante na miotoxicidade do resíduo de aminoácido K₂₀, além dos resíduos

catiônicos K115 e R118 da região C-terminal, e um importante papel estabilizador para Y119.

Mais uma vez, é importante salientar que o mecanismo de ação dessas miotoxinas ainda não está bem elucidado, mas, todos esses modelos propostos, indicam um importante papel para os resíduos catiônicos e hidrofóbicos da região C-terminal dessa classe de proteínas, além disso, o ultimo estudo citado, indica um importante papel da K20.

Figura 41: Modelos propostos para o sítio miotóxico das miotoxinas Lys49. Estrutura tridimensional dos dímeros (Nesta figura foram representados somente os dímeros alternativos). Resíduos propostos a ter um papel central no efeito tóxico destas proteínas, de acordo com cada modelo proposto (A-D), são mostrados em vermelho. Modelos A e C baseiam-se em dados experimentais a partir de estudos com peptídeos sintéticos (LOMONTE et al., 1994) (A) ou de mutagênese dirigida ao local (CHIOATO et al., 2002) (C). Modelos B e D são preditivos, baseados em comparações de sequência (SELISTRE-DE-ARAÚJO et al., 1996) (B) ou análises tridimensionais cristalográficas (DOS SANTOS et al., 2009) (D). As figuras foram confeccionadas utilizando o programa Pymol. Figura baseada em Lomonte e Rangel (2012).

Portanto, uma vez bem resolvida a estrutura quaternária das miotoxinas e bem elucidado seus prováveis sítios miotóxicos, foi realizado o estudo de *docking* molecular. O *Docking* Molecular é um método de estudo computacional que analisa os prováveis sítios de interação entre um ligante, em um alvo macromolecular, como por exemplo, uma proteína.

Este estudo foi realizado utilizando a estrutura quaternária trimérica do α BaltMIP, estrutura esta conhecida como sendo sua conformação em solução (SOARES et al., 2003; OKUMURA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2008; NISHIDA et al., 2010), além disso foi também utilizada a estrutura quaternária dimérica das miotoxinas Lys49, já que este estado é fundamental para a atividade dessas moléculas (DOS SANTOS et al., 2009; LOMONTE; RANGEL, 2012) e , além disso, foi levado em conta somente a estrutura quaternária das PLA₂s homólogas denominadas “dímero alternativo”, já que essa é a forma mais encontrada na natureza (DOS SANTOS et al., 2009; LOMONTE; RANGEL, 2012). Os resultados do *docking* mostraram que as interações mais favoráveis entre o alfa inibidor plasmático α BaltMIP com BthTX-I se situam na região do sítio de reconhecimento de carboidrato (CRD) do α BaltMIP e na região C-terminal da BthTX-I, região essa apontada por vários autores como o sítio miotóxico das Lys49 (Lomonte et al., 2012).

Okumura et al., (2005) e Nishida e colaboradores (2010) em seus respectivos estudos destacam a importância da “região pescoço”, principalmente a encontrada entre os resíduos de aminoácidos compreendidos entre 13-36, dos alfa inibidores para as suas respectivas atividades inibitórias. Contudo, nossos trabalhos especulam que essa região não é a responsável pela atividade inibitória do α BaltMIP em si, mas sim pela trimerização dessa proteína. Contudo, essa estrutura quaternária adquirida pela proteína é fundamental para a atividade inibitória da mesma, demonstrando o papel importante dessa “região pescoço” da macromolécula e confirmando, indiretamente, sua importância para a atividade inibitória.

Vários resíduos de aminoácidos presentes nas miotoxinas estudadas pareceram interagir com o alfa inibidor no estudo de *docking* macromolecular, inclusive resíduos ditos como pertencentes aos sítios miotóxicos nos diferentes

estudos citados, os quais são Lys20 (DOS SANTOS et al., 2009), Arg118 (LOMONTE et al., 1994; CHIOATO et al., 2002; LOMONTE; RANGEL, 2012), Lys115 (Lomonte et al., 1994; Chioato et al., 2002; Lomonte e Rangel, 2012), Tyr119 (Lomonte et al., 1994; CHIOATO et al., 2002; DOS SANTOS et al., 2009, LOMONTE; RANGEL, 2012), entre outros. É interessante ressaltar que, os resíduos catiônicos e hidrofóbicos da região C-terminal das PLA₂s símile Lys49 são os responsáveis pela atividade citotóxica dessas moléculas (NÚÑEZ et al., 2001; LOMONTE et al., 2003; LOMONTE et al., 2010).

Como essa região catiônica e hidrofóbica das miotoxinas é responsável pela atividade citotóxica (NÚÑEZ et al., 2001; LOMONTE et al., 2003; LOMONTE et al., 2010) e parece ter relevância na atividade miotóxica (LOMONTE et al., 1994; CHIOATO et al., 2002; DOS SANTOS et al., 2009; LOMONTE; RANGEL, 2012) dessas PLA₂s homólogas, e como essa região parece ter interação com os alfa inibidores, esse pode ser o motivo desses inibidores inibirem tanto a atividade miotóxica, quanto citotóxica dessas proteínas. Como citado anteriormente, estudos mais específicos, como a co-cristalização entre essas duas macromoléculas e/ou mutagênese sítio-dirigidas podem trazer melhores esclarecimentos e confirmar ou não as hipóteses levantadas no presente trabalho.

Resumindo, no presente trabalho foi purificado e caracterizado um alfa inibidor de miotoxinas com grande aplicação biotecnológica na complementação da soroterapia convencional, além disso, com os estudos de *docking* macromolecular foi especulado um sítio de interação entre esses inibidores e as miotoxinas, abrindo novas perspectivas para um melhor entendimento do mecanismo de ação dos α PLIs. Assim, as informações obtidas no presente estudo podem colaborar para uma melhor compreensão das características bioquímica, estrutural e funcional destes inibidores plasmáticos de serpentes.

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi isolado um α PLI do plasma da serpente *Bothrops alternatus*, denominado α BaltMIP, por coluna de afinidade, utilizando BthTX-I acoplada à resina Sepharose. Este inibidor possui massa molecular relativa de 24.000 na presença do agente redutor β -mercaptoetanol e apresentou um excelente grau de pureza tanto em HPLC quanto em SDS-PAGE 12%.

Com o intuito de analisar as propriedades inibitórias desta proteína, foram avaliadas as atividades miotóxica, citotóxica, fosfolipásica e anticoagulante na presença e ausência de α BaltMIP, a qual indicou que α BaltMIP apresentou inibição sobre diferentes PLA₂s isoladas de peçonhas de serpentes. Os resultados obtidos demonstraram que o α BaltMIP apresenta maior afinidade sobre as PLA₂s-símbles Lys49 como BthTX-I e PrTX-I, que sobre as Asp49 PLA₂, mas, ainda assim, apresenta inibição sobre essas enzimas.

Os espectros de DC dos complexos PLA₂/ α BaltMIP mostraram diferenças daqueles correspondentes às proteínas individuais e dados de deconvolução sugerem que os complexos tiveram um ganho relativo de elementos de estrutura helicoidal em relação às proteínas individuais, o que pode indicar uma estrutura mais compacta na formação do complexo.

Estudos estruturais teóricos e experimentais realizados sobre as características estruturais dos α BaltMIP indicam que esta molécula pode potencialmente trimerizar em solução, reforçando a hipótese já levantada por outros autores sobre oligomerização de PLIs do tipo α provenientes de plasma de serpentes.

Além disso, foi realizada com sucesso a clonagem e expressão deste inibidor, denominado rBaltMIP. A expressão da proteína recombinante foi realizada em sistema heterólogo de expressão na levedura *Pichi pastoris*. As vantagens de expressão de proteínas recombinantes em leveduras, são conhecidas pois, como são seres eucariotos, esses sistemas são capazes de realizar modificações pós traducionais. Além disso, esses sistemas possuem a vantagem da ausência de

necessidade de se renovar quimicamente a proteína de interesse, diminuindo assim a possibilidade de erros na expressão das macromoléculas, além de produzir moléculas secretadas e em grande quantidade, não necessitando a purificação de moléculas em corpos de inclusão, como em sistemas procariotos. A expressão de rBaltMIP possibilitará a obtenção desse inibidor em grandes escalas, e consequentemente, a realização de trabalhos mais aprofundados no que diz respeito à possível elucidação do mecanismo de inibição das PLA₂s de serpentes, o qual ainda não foi totalmente esclarecido. Por outro lado, em futuros estudos, poderá ser realizada a cristalografia desse inibidor expresso bem como, a co-cristalização do inibidor/miotoxina, elucidando o mecanismo de interação entre essas duas moléculas. A técnica de cristalografia de proteínas se tornará viável com o inibidor expresso, pois essa metodologia exige uma grande quantidade dessas macromoléculas puras, o que seria complexo de se conseguir com a proteína nativa, devido à dificuldade de obtenção do sangue da serpente e do baixo rendimento de purificação dessas moléculas.

A expressão heteróloga do rBaltMIP possibilitará a obtenção desse inibidor em grande escala, e consequentemente, a realização de trabalhos mais aprofundados no que diz respeito à possível elucidação do mecanismo de inibição das PLA₂s de serpentes, o qual ainda não foi totalmente esclarecido. Além disso, novas informações em relação ao mecanismo de ação desses inibidores poderão ser conhecidas, na tentativa de melhor entender a aplicação destes, como novo modelo terapêutico com ação antiofídica na neutralização de diferentes tipos de Fosfolipases A₂, na suplementação da soroterapia convencional e também na interação molecular com Fosfolipases A₂.

A caracterização bioquímica parcial e a caracterização funcional do inibidor expresso mostrou que o rBaltMIP foi purificado em alto grau de pureza, apresentando 100% de identidade sequencial (N-terminal) com o inibidor nativo. Além disso, o rBaltMIP foi capaz de diminuir parcialmente a atividade fosfolipásica de diferentes proteínas (PLA₂s e PLA₂s homólogas), o que mostra o grande sucesso da expressão heteróloga dessa proteína, pois foi purificada uma proteína com alto grau de pureza e na forma ativa. Por outro lado, quando utilizada proporções molares de 3:1 (inibidor:PLA₂) o rBaltMIP demonstrou maior rendimento de inibição; resultado que corrobora com dados da literatura, que supõem que esses inibidores

tem uma taxa de complexação inibidor:PLA₂ na proporção 3:1. Mostrou ainda, que o rBaltMIP inibiu as atividades miotóxica e citotóxica, de diferentes miotoxinas PLA₂s tanto Lys49 quanto Asp49.

Sabe-se, a mionecrose é uma importante complicação dos envenenamentos, principalmente os do gênero *Bothrops* e, em casos graves, essa mionecrose pode levar a seqüelas como a perda de tecido permanente, incapacidade ou amputação do membro, o que acarreta grande problema tanto para o indivíduo afetado, quanto para a saúde pública, pois pode incapacitar o indivíduo de trabalhar e diminuir a qualidade de vida deste, além disso onera os cofres públicos, pois complica o atendimento de saúde, aumenta o tempo de internação e cirurgias, além do que, em alguns casos, pode levar a uma aposentadoria precoce. Com isso, a busca por proteínas que neutralizem miotoxinas em envenenamentos se torna de grande valia.

Como se sabe que o soro antiofídico tradicional não é capaz de inibir os efeitos locais do envenenamento, causado principalmente pelas miotoxinas, uma complementação da soroterapia tradicional é proposta neste estudo, o que mais uma vez demonstra que o presente estudo identificou uma molécula de grande potencial terapêutico contra o envenenamento, com a inibição da atividade miotóxica das miotoxinas presentes nas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARADO, J.; GUTIERREZ, J.M. Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae). *Rev biol trop*, v.36; p.563-565, 1988.
- 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.; FULY, A.L.; CORREA, F.M.; 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. *Biochem Pharmacol.*, v.64, p.723-732, 2002.
- ANGULO, Y.; NUNEZ, C.E.; LIZANO, S.; SOARES A.M.; LOMONTE, B. Immunochemical properties of the N-terminal helix of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* v.39, p. 879-887, 2001.
- ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A₂ - A structural review. *Toxicon*, v.34, p.827-841, 1996.
- AZEVEDO-MARQUES, MM.; 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*, 23, p. 631-636, 1985.
- BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do gênero *bothrops*, *lachesis* e *micrurus*. *Aquivo Brasileiro de Medicina*. v.65, p.345-355, 1991.
- BERENDSEN, H.J.C.; POSTMA, J.P.M.; VAN GUNSTEREN, W.F.; HERMANS, J. Interaction models for water in relation to protein hydration. In: B. Pullman, Editor, *Intermolecular Forces*, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, pp. 331-342, 1981.
- BERENDSEN, H.J.C.; Van Der SPOEL D.; Van DRUNEN, R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* v.91, p. 43-56, 1995.

- BONFIM, V.L.; TOYAMA, M.H.; NOVELLO, J.C.; HYSLOP, S.; OLIVEIRA, C.R.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. *J Protein Chem.*, v.20, p.239-45, 2001.
- BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipase A₂. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, v. 127, p. 21-30, 2000.
- BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; OLIVEIRA, F.; FRANSCHESCHI, A.M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon*, v.39, p.1863-9, 2001.
- BRAZIL, V. Dosagem do valor atitóxico dos serums antipeçonhentos. *Rev. Med. São Paulo*, 1907.
- BRÜNGER, A.T.; ADAMS, P.D.; CLORE, G.M.; DELANO, W.L.; GROS, P.; GROSSE-KUNSTLEVE, R.W.; JIANG, J.S.; KUSZEWSKI, J.; NILGES, M.; PANNU, N.S.; READ, R.J.; RICE, L.M.; SIMONSON T.; WARREN, G.L. Crystallography and NMR system (CNS): a new software system for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D*, v.54, p. 905-921, 1998.
- CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD Jr, V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Editora Sarvier, 2003.
- CAVALCANTE, W.L.G.; CAMPOS, T.O.; DAL PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P.S.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. *J. Ethnopharmacol.*, v. 112, p. 490-7, 2007.
- CHIOATO, L.; WARD, R. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. *Toxicon*, v.42, p.869-883, 2003.
- CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; PIZZO, P.; ÂNGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; MONTECUCCO, C.; LOMONTE, B. The C-terminal region of a Lys49 myotoxin mediates Ca²⁺ influx in C2C12 myotubes. *Toxicon*, v.55, p.590-6, 2010.

- COSTA, T.R.; MENALDO, D.L.; OLIVEIRA, C.Z.; SANTOS-FILHO, N.A.; TEIXEIRA, S.S.; NOMIZO, A.; FULY, A.L.; MONTEIRO, M.C.; De SOUZA, B.M.; PALMA, M.S.; STÁBELI, R.G.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. Myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. *Peptides*, v.29, p.1645-1656, 2008.
- da SILVA, J.O.; COPPEDE, J.S.; FERNANDES, V.C.; SANT'ANA, C.D.; TICLI, F.K.; MAZZI, M.V.; GIGLIO, J.R.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. *J Ethnopharmacol.*, v.22; p.145-52, 2005.
- da SILVA, J.O.; FERNANDES, R.S.; TICLI, F.K.; OLIVEIRA, C.Z.; MAZZI, M.V.; FRANCO, J.J.; GIULIATTI, S.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. *Toxicon*, v.50, p.283-91, 2007.
- da SILVA, M.L.; MARCUSSI, S.; FERNANDES, R.S.; PEREIRA, P.S.; JANUÁRIO, A.H.; FRANÇA, S.C.; da SILVA, S.L.; SOARES, A.M.; LOURENÇO, M.V. Anti-snake venom activities of extracts and fractions from callus cultures of *Sapindus saponaria*. *Pharm Biol.*, v.50, p.366-75, 2012.
- Dos SANTOS, J.I.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. *Journal of Structural Biology*, v.167, p.106-116, 2009.
- 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.; RHEE, S.G.; BILLAH, M.M.; HANNUN, Y.A. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J.*, v.5, p.2068-2077, 1991.
- DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipases A₂. *J. Biol. Chem.*, v.269, p.13057-13060, 1994.
- DOMONT, G.B.; PERALES, J.; MOUSSATCHE, H. Natural anti-snake venom proteins. *Toxicon*, v. 29, p. 1183-94, 1991.
- 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.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILLAUME, J.L.; MONEGIER, B.; VUILHORGNE, M.; Bon, C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur J Biochem.*, v. 223, p. 161-164, 1994.
- FAURE, G. Natural inhibitors of toxic phospholipases A₂. *Biochem.*, v.82, p.833-840, 2000.
- FENWICK, A.M.; GUTBERLET JR, R.L.; EVANS, J.A.; PARKINSON, C.L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 156, p.617-640, 2009.
- FISHER, A.B.; DODIA, C.; CHANDER, A.; BEERS, M.F.; BATES, S.R. Inhibition of *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A₂ by lung surfactant protein A (SP-A). *Biochim Biophys Acta*. V.1211, p.256-62, 1994.
- FORTES-DIAS, C.L.; LIN, Y.; EWELL, J.; DINIZ, C.R.; LIU, T.Y. A phospholipase A₂ inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Protein structure, genomic structure, and mechanism of action. *J Biol Chem.*, v.269, p.15646-51, 1994.
- FORTES-DIAS, C.L. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipase A₂ in the blood plasma of snakes. *Toxicon*, v.40, p.481-484, 2002.
- FORTES-DIAS, C.L.; BARCELLOS, C.J.; ESTEVÃO-COSTA, M.I. Molecular cloning of a γ-phospholipase A₂ inhibitor from *Lachesis muta muta* (the bushmaster snake). *Toxicon*, v. 41, p. 909-17, 2003.
- FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente Botrópico. In: Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes. p.72-86, 2003.
- FULY, A.L.; CALIL-ELIAS, S.; MARTINEZ, A.M.B.; MELO, P.A.; GUIMARÃES, J.A. Myotoxicity induced by an acidic Asp-49 phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* snake venom Comparison with lysophosphatidylcholine. *Int. J. Biochem. Cel.l Biol.*, v.35, p.1470-1481, 2003.

- GUTIÉRREZ, J.M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. Alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, v.26, p.411-413, 1988.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini, R.M.; (Ed.); *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure; Function and Mechanism*; Wiley; Chichester, pp.321-352, 1997.
- HAINS, P.G.; BROADY, K. Purification and inhibitory profile of phospholipase A₂ inhibitors from Australia *elapid* sera. *Biochem. J.*, v. 346, p. 139-46, 2000.
- HAINS, P.G.; NIELD, B.; SEKULOSKI, S.; DUNN, R.; BROADY, K. Sequencing and two-dimensional structure prediction of a phospholipase A₂ inhibitor from the serum of the common Tiger snake (*Notechis scutatus*). *J. Mol. Biol.*, v. 312, p. 875-84, 2001.
- HARRIS, J.B.; CULLEN M.J. Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. *Electron Microsc. Rev.*, v. 3 , p. 183-211, 1990.
- HARRIS, J.B.; GRUBB, B.D.; MALTIN, C.A.; DIXON, R. The neurotoxicity of the venom phospholipases A₂; notexin and taipoxin. *Exp. Neurol.*, v.161, p.517-526, 2000.
- HENDON, R.A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.68, p.1560-1563, 1971.
- HIGUCHI, D.A.; BARBOSA, C.M.V.; BINCOLETTO, C.; CHAGAS, J.R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F.; PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; PESQUERO, J.L. Purification and partial characterization of two phospholipases A₂ from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. *Biochimie*, v.89, p.1-10, 2006.
- 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.; 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.

- JONES, T.A.; BERGDOLL, M.; KJELDGAARD, M. O: a macromolecule modeling environment. In: C.E. Bugg and S.E. Ealick, Editors, *Crystallographic and Modeling Methods in Molecular Design*, Springer-Verlag, New York, pp. 189-195, 1990.
- JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiologia e Quadro Clínico do Acidente por Cascavel Sul-Americana (*C. durissus*). *Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.34, p.347-354, 1992.
- KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon*, v.42, p.827-40, 2003.
- 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.
- KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. Prostaglandins e other lipid mediators, 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.
- LINDAHL, E.; HESS, B.; Van Der SPOEL, R. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis, *J. Mol. Model.*, v.7, p. 306-317, 2001.
- 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.
- 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.
- LOMBARDO, D.; DENNIS, E.A. Cobra venom phospholipase A₂ inhibition by manoalide. A novel type of phospholipase inhibitor. *J Biol Chem.*, v.260, p.7234-40, 1985.

- LOMONTE, B.; RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon*, v.60, p.520-530, 2012
- LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.Å.; MACCARANA, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a Lys-49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 29867–29873, 1994.
- LOMONTE, B.; ANGULO, 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. *Curr Pharm Des.*, v.16, p.3224-3230, 2010.
- LOVELL, S.C.; DAVIS, I.W.; ARENDALL III, W.B.; de BAKKER, P.I.W.; WORD, J.M.; PRISANT, M.G.; RICHARDSON, J.S.; RICHARDSON, D.C. Structure validation by Calpha geometry: phi, psi and Cbeta deviation. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, v.50, p. 437-450, 2003.
- MAGRO, A.J.; TAKEDA, A.A.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R. Structure of BthA-I complexed with p-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activity. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, v.61, p.1670-7, 2005.
- MANCUSO, L.C.; CORREA, M.M.; VIEIRA, C.A.; CUNHA, O.A.; LACHAT, J.J.; De ARAUJO, H.S.; OWNBY, C.L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. *Toxicon*, v.33, p.615-626, 1995.
- MARCHI-SALVADOR, D.P.; CORRÊA, L.C.; MAGRO, A.J.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A₂ formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Proteins*, v.72, p.883-891, 2008.
- 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.

- MARTI-RENOM, M.A.; STUART, A.; FISER, A.; SÁNCHEZ, R.; MELO, F.; SALI, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, v.29, p. 291-325, 2000.
- 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.
- MELO, P.A.; DO NASCIMENTO, M.C.; MORS, W.B.; SUAREZ-KURTZ, G. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostate* (Asteraceae) extracts and constituents. *Toxicon*, v. 32, p.595-603, 1994.
- MELO, P.A.; OWNBY, C.L. Ability of wedelolactone, heparin, and parabromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects two crotaline venoms and their PLA₂ myotoxins. *Toxicon*, v. 37, p. 199-215, 1999.
- 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.
- MINISTÉRIO da SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acessado em 25/11/2012.
- MORS, W.B.; NASCIMENTO, M.C.; PEREIRA, B.M.; PEREIRA, N.A. Plant natural products active against snake bite--the molecular approach. *Phytochemistry*, v.55, p.627-42, 2000.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J immun met.*, v.65, p.55-63, 1983.
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v.1804, p.2121-2127, 2010.
- 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.
- NOBUHISA, I.; DESHIMARU, M.; CHIWATA, T.; NAKASHIMA, K.; OGAWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; SAKAKI, Y.; HATTORI, S.; KIHARA, H.; OHNO, M. Structures of genes encoding phospholipase A₂ inhibitors from the serum of *Trimeresurus flavoviridis* snake, *Gene*, v.191, p. 31-37, 1997.

- NOBUHISA, I.; CHIWATA, T.; FUKUMAKI, Y.; HATTORI, S.; SHIMOHIGASHI, Y.; OHNO, M. Structural elements of *Trimeresurus flavoviridis* serum inhibitors for recognition of its venom phospholipase A₂ isozymes. *FEBS Lett.*, v.429, p.385-389, 1998.
- 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, 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.
- OHKURA, N.; OKUHARA, H.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A₂ inhibitors from the blood plasma of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. *Biochem. J.*, v. 325, p. 527-31, 1997.
- 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.; MASUI, K.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Purification, characterization and cDNA cloning of a phospholipase A₂ inhibitor from the serum of the non-venomous snake *Elaphe quadrivirgata*. *Biochem. J.*, v. 341, p. 165-71, 1999.
- 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.; OHNO, A.; NISHIDA, M.; HAYASHI, K.; IKEDA, K.; INOUE, S. Mapping the region of the alpha-type phospholipase A₂ inhibitor responsible for its inhibitory activity. *J Biol Chem.*, v.280, p.37651-37659, 2005.
- 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 antifibrinolytic 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.
- OOSTENBRINK, C.; SOARES, T.A.; Van Der VEGT, N.F.A.; Van GUNSTEREN, W.F. Validation of the 53A6 GROMOS force field. *Eur. Biophys. J.*, v.34, p. 273-284, 2005.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. 2008.
- OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.M.; MESA, M.B; DUQUE, E.; RODRÍGUEZ, O.; ARANGO, J.L.; GÓMEZ, F.; TORO, A.; CANO, F.; RODRÍGUEZ, L.M.; Caro, E.; MARTÍNEZ, J.; CORNEJO, W.; GÓMEZ, L.M.; URIBE, L.; CÁRDENAS, S.; NÚÑEZ, 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, p. 1107-1114, 2002.
- OUYANG, C.; TENG, C.M.; HUANG, T.F. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon*, v.30, p.945-966, 1992.
- OVADIA, M.; KOCHVA, E. Neutralization of *Viperidae* and *Elapidae* snake venoms by sera of different animals. *Toxicon*, v. 15, p. 541-47, 1977.
- 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.
- PERALES, J.; VILLELA, C.; DOMONT, G.B.; CHOUMET, V.; SALIOU, B.; MOUSSATCHÉ, H.; BON, C.; FAURE, G. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. *Eur J Biochem.*, v.227, p.19-26, 1995.
- PERALES, J.; DOMONT, G.B. Are inhibitors of metalloproteinases, phospholipases A₂ and myotoxins members of the innate immune system. In: A. Ménez, Editor, *Perspectives in Molecular Toxinology*, Wiley, Chichester, pp. 435-456, 2002.
- PINHO, F.M.O. e PEREIRA, I.D. Ofidismo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.47, 24-29, 2001.
- 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.

- RADVANYI, F.; KEIL, A.; SALIOU, B.; LEMBEZAT, M.P.; BON, C. Binding of divalent and trivalent cations with crotoxin and with its phospholipase and its non-catalytic subunits: effects on enzymatic activity and on the interaction of phospholipase component with phospholipids. *Biochim Biophys Acta*. V.1006, p.183-92, 1989.
- RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B.W.; DRENT, J.; Sigler P.B. A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J. Biol. Chem.*, v.260, p. 11627-11634, 1985.
- REYNOLDS, L.J.; MIHELICH, E.D.; DENNIS, E.A. Inhibition of venom phospholipases A₂ by manoalide and manoalogue. Stoichiometry of incorporation. *J Biol Chem.*, v.266, p.16512-7, 1991.
- 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.
- SALVADOR, G.H.; FERNANDES, C.A.; CORRÊA, L.C.; SANTOS-FILHO, N.A.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of crotoxin B from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.*, v.65, p.1011-1013, 2009.
- SAMY, R.P.; PUSHPARAJ, P.N.; GOPALAKRISHNAKONE, P. A compilation of bioactive compounds from Ayurveda. *Bioinformation*, v.3, p.100-10, 2008.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*, v. 74, p.5463-5467, 1977.
- SANTOS-FILHO, N.A.; SILVEIRA, L.B.; OLIVEIRA, C.Z.; BERNARDES, C.P.; MENALDO, D.L.; FULY, A.L.; ARANTES, E.C.; SAMPAIO, S.V.; MAMEDE, C.C.; BELETTI, M.E.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A.M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, v.52, p.908-917, 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.

- SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta*, v.1761, p.1246-1259, 2006.
- SCHWARTZ, A.S.; PACTER, L. Multiple alignment by sequence annealing, *Bioinformatics*, v.23, p. 24-29, 2007.
- SELISTRE de ARAÚJO, H.S.; FERREIRA de SOUZA, D.H. Métodos em toxinologia: toxinas de serpentes. pp. 258, 2007.
- 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.
- SHRIVE, A.K.; THARIA, H.A.; STRONG, P.; KISHORE, U.; BURNS, I.; RIZKLLAH, P.J.; REID, K.B.M.; GREENHOUGH, T.J. High-resolution structural insights into ligand binding and immune cell recognition by human lung surfactant protein D. *J. Mol. Biol.*, v.331, p.509-523, 2003.
- SINGH, S.B.; ARMUGAM, A.; KINI, R.M.; KANDIAH, J. Phospholipase A₂ with platelet aggregation inhibitor activity from *Austrelaps superbis* venom: protein purification and cDNA cloning. *Arch Biochem Biophys.*, v.375, p.289-303, 2000.
- 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.
- SO, S.; CHIJIIWA, T.; IKEDA, N.; NOBUHISA, I.; ODA-UEDA, N.; HATTORI, S.; OHNO, M. Identification of the B subtype of gamma-phospholipase A₂ inhibitor from *Protobothrops flavoviridis* serum and molecular evolution of snake serum phospholipase A₂ inhibitors. *J. Mol. Evol.*, v. 66, p. 298-307, 2008.
- 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 proteases, mytoxins 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.; GIGLIO, J.R. Chemical modifications of phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. *Toxicon*; v.42, p.855-868, 2003. Review.
- 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.; STÁBELI, 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.
- SOARES, A.M.; TICLI, F.K.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M.V.; JANUÁRIO, A.H.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P.S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. *Curr Med Chem.*, v.12, p.2625-41, 2005.
- SÖDING, J.; BIEGERT A.; LUPAS, A.N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.*, v.33, p. 244-248, 2005.
- 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.
- 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.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; KINI, R.M.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Recombinant antitoxic and anti-inflammatory factor from the nonvenomous snake *Python reticulatus*: Phospholipase A₂ inhibition and venom neutralizing potential. *Biochem.*, v. 39, p. 9604-11, 2000.
- 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.
- TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. *Pesq Vet Bras.* [online]. v.26,p.55-68; 2006.
- TOYAMA, T.; TERAMOTO, H.; ISHIGURO, S.; TANAKA, A.; OKADA, K.; TAKEBA, G. A cytokinin-repressed gene in cucumber for a bHLH protein homologue is regulated by light. *Plant Cell Physiol.*, v.40, p.1087-1092, 1999.
- 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.
- 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.

- WHITMORE, L.; WALLACE, B.A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*, v.89, p. 392-400, 2008.
- WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M.J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.*, v. 3, p. W407-W410, 2007.