CAROLINE SERINO SILVA

**Purificação e caracterização do primeiro inibidor de
fosfolipase A₂ do tipo gama presente no soro da serpente**

Bothrops jararaca

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do título de Mestre
em Biotecnologia.

São Paulo
2017

CAROLINE SERINO SILVA

**Purificação e caracterização do primeiro inibidor de
fosfolipase A₂ do tipo gama presente no soro da serpente**

Bothrops jararaca

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof. Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Serino-Silva, Caroline
Purificação e caracterização do primeiro inibidor
de fosfolipase A2 do tipo gama presente no soro da
serpente Bothrops jararaca / Caroline Serino-
Silva; orientador Anita Mitico Tanaka Azevedo. --
São Paulo, 2017.
62 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Bothrops jararaca. 2. Inibidores. 3.
Fosfolipase A2. 4. Biotecnologia. 5. Soro. I.
Mitico Tanaka Azevedo, Anita, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato: Caroline Serino Silva

Titulo da Dissertação: Purificação e caracterização do primeiro inibidor de fosfolipase A₂ do tipo gama presente no soro da serpente *Bothrops jararaca*

Orientador: Anita Mítico Tanaka Azevedo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB)
INSTITUTO BUTANTAN

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo das proteínas de serpentes de interesse biotecnológico: mecanismo de defesa presente no plasma de serpentes contra o auto envenenamento e proteínas de veneno com potencial terapêutico", **protocolo nº 1374/15**, sob a responsabilidade de Anita Mitiko Tanaka Azevedo e Caroline Serino Silva – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 21/9/2016.

This is to certify that the proposal "Study of snake proteins with biotechnological interest: defense mechanism present in snake plasma against self-envenomation and proteins with therapeutic potential", protocol nº 1374/15, under the responsibility of Anita Mitiko Tanaka Azevedo and Caroline Serino Silva – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 9/21/2016. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	Observação
03/2015 - 02/2017 Laboratório de Herpetologia	40 Camundongos Swiss 18-20g (M)	Inclusão de animais

São Paulo, 22 de setembro de 2016

Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

À minha mãe Arlete, meu pai Antônio Carlos e minha irmã Jackeline. Por me darem todo o apoio e amor que eu poderia receber nesta vida. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Arlete e Antônio Carlos, os quais me deram todo o apoio e proteção desde o dia em que eu nasci. Que eu sei que se desdobram para não faltar nada para mim e para minha irmã. E eu os considero o símbolo de honestidade e caráter o qual eu sigo. Obrigada por cada demonstração de amor e carinho, e ainda mais por cada ensinamento e puxão de orelha. Espero que um dia eu possa proporcionar a vocês um pouco do orgulho que vocês me causam.

À minha irmã, Jackeline, embora muitas vezes não pareça, quero dizer a você que eu te amo incondicionalmente e que estarei ao seu lado para o que você precisar. Espero que você tenha sucesso em alcançar todos os seus sonhos. Conte comigo!

À minha orientadora, Dr^a Anita Mitico Tanaka Azevedo, por sempre confiar em mim e estar sempre me incentivando a continuar nesta jornada científica. Obrigada também por todo apoio e dedicação que você tem tido desde o primeiro dia da Iniciação Científica, espero poder retribuir tudo o que tem feito por mim.

À Dr^a Karen de Moraes Zani, com quem eu aprendi muita coisa no laboratório, está sempre disposta a me auxiliar e esclarecer muitas dúvidas. Obrigada por estar sempre atenta aos mínimos detalhes, tornando o trabalho escrito e o nosso local de trabalho sempre mais claro. Obrigada também pela amizade.

Àqueles que eram de início apenas colegas de trabalho, mas logo se tornaram grandes amigos dentro e fora do laboratório, Wéslei Aguiar, Iasmim Baptista de Farias, Daniela Miki Hatakeyama, Lidia Jorge Tasima, Nathália Galizio, Fernanda Sanches e Henrique Sericaku. Espero que, mesmo depois de cada um seguir o seu caminho, vocês não se esqueçam de mim, pois eu não me esquecerei de vocês.

À Dr^a. Kathleen Fernandes Grego, Diretora do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, por permitir a realização deste trabalho.

Ao Dr. Sávio Stefanini Sant'Anna, do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pela extração de venenos das serpentes.

A todos do laboratório de Herpetologia pelo apoio, desde os funcionários terceirizados, alunos de todos os níveis, PAPs, técnicos e pesquisadores, que trabalham com muito amor e dedicação em prol do bem-estar das serpentes e do desenvolvimento acadêmico.

Ao Dr. Alexandre Keiji Tashima e à UNIFESP pela análise da amostra por espectrometria de massas.

Ao Dr. Marcos Hikari Toyama e seus alunos do laboratório da UNESP, Henrique Hessel Gaeta, Caroline Fabri Bittencourt Rodrigues, Mariana Belchor e Caroline Jaime Costa. Obrigada pela hospitalidade e o auxílio no desenvolvimento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro.

RESUMO

SERINO-SILVA, C. **Purificação e caracterização do primeiro inibidor de fosfolipase A₂ do tipo gama presente no soro da serpente *Bothrops jararaca*.** 2017 62 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Acidentes por serpentes peçonhentas são considerados um importante agravo à saúde, em virtude do número de ocorrências. O veneno da serpente *Bothrops jararaca* é uma solução complexa que possui proteínas como as metaloproteinases, as serinoproteinases, as fosfolipases A₂, as desintegrinas e as miotoxinas. Fosfolipases A₂ (PLA₂) são enzimas que atuam, nos fosfolipídios das membranas celulares, formando ácidos graxos e lisofosfolipídios, desconstruindo assim as membranas celulares. Estas proteínas são comumente encontradas em veneno de serpentes causando inflamação tecidual na área afetada. Evidências indicam que serpentes possuem uma resistência natural devido às propriedades presentes no sangue, que inibem as atividades de proteínas presentes no veneno. Portanto, no presente trabalho foi isolado e caracterizado bioquimicamente e biologicamente o primeiro inibidor de fosfolipase tipo gama (γ PLI) do soro da serpente *Bothrops jararaca*, denominado BjPLI γ . O inibidor de PLA₂ foi isolado utilizando dois passos cromatográficos, uma coluna de troca iônica (DEAE), seguida de uma coluna de afinidade (crotoxina acoplada a uma resina de Sepharose ativada com CNBr). A pureza e a caracterização bioquímica do BjPLI γ foi analisada por HPLC, SEC, SDS-PAGE e espectrometria de massa. O BjPLI γ também foi analisado por dicroísmo circular. A capacidade do BjPLI γ de inibir PLA₂ foi determinada pela capacidade de neutralização da atividade enzimática, do edema da pata e da mionecrose. A pureza do BjPLI γ foi confirmada por HPLC e SEC, que mostraram apenas um pico. O BjPLI γ mostrou, por SDS-PAGE, uma massa molecular de 25 kDa e 20 kDa em condições redutoras e não redutoras, respectivamente. A sequência de aminoácidos parcial de BjPLI γ foi determinada por espectrometria de massa e corresponde a 72% e 68% de cobertura da sequência de aminoácidos de duas proteínas já descritas como PLI. O BjPLI γ mostrou também atividade inibitória satisfatória nos três testes realizados, sugerindo um papel deste inibidor nos efeitos de envenenamento da serpente.

Palavras-chave: *Bothrops jararaca*. Soro. Biotecnologia. Fosfolipase A₂. Inibidores.

ABSTRACT

SERINO-SILVA, C. **Purification and characterization of the first gamma-type phospholipase A₂ inhibitor present in *Bothrops jararaca* snake serum.** 2017. 62 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Accidents caused by venomous snakes are considered an important health problem due to the number of occurrences. *Bothrops jararaca* venom is a complex solution containing proteins such as metalloproteinases, serine proteinases, phospholipases A₂, disintegrins and myotoxins. Phospholipases A₂ (PLA₂) are enzymes that act on cell membrane phospholipids resulting in fatty acids and lysophospholipids, deconstructing the cell wall. This protein is commonly found in snake venoms, causing tissue inflammation in the area affected by the snakebite. Evidence indicates that snakes have natural resistance due to protective properties of blood that inhibits the action of proteins present in the venom. This study aimed to purify and characterize PLA₂ inhibitors (PLI) from serum of the *Bothrops jararaca* snakes. PLA₂ inhibitor was isolated using two chromatographic steps, an ion exchange column (DEAE) followed by an affinity column (crotoxin coupled to a CNBr-activated Sepharose resin), and was named BjPLI γ . The purity and biochemical characterization of the BjPLI γ was analyzed by HPLC, SEC, SDS-PAGE and mass spectrometry. BjPLI γ was also analyzed by circular dichroism. The BjPLI γ ability to inhibit PLA₂ was determined by enzymatic activity inhibition and analyses of paw edema and myonecrosis neutralization. The purity of the BjPLI γ was confirmed by HPLC and SEC, that showed only one peak. The BjPLI γ showed, by SDS-PAGE, an apparent molecular mass of 25 kDa and 20 kDa under reducing and non-reducing conditions, respectively. The partial amino acid sequence of BjPLI γ was determined by mass spectrometry and it corresponds to 72% and 68% of coverage of the amino acid sequence of two proteins already described as PLI. The BjPLI γ also showed satisfactory inhibitory activity in the three tests performed suggesting a role of this inhibitor in snake envenomation effects.

Keywords: *Bothrops jararaca*. Serum. Biotechnology. Phospholipase A₂. Inhibitors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Representação dos transcritos de toxinas putativas de *B. jararaca*. MPs: metaloproteinases; SPs: serino proteases; BPPs; peptídeos potenciadores de bradicinina; PLA₂: fosfolipases A₂; LAAO: L-aminoácido oxidases; CRISPs: proteínas secretadas ricas em cisteínas; svVEGF: fatores de crescimento do endotélio vascular; svNGF: fatores de crescimento do nervo (Zelani et al., 2012). **19**
- Figura 2** - Classificação das fosfolipases de acordo com a posição de hidrólise em fosfolipídios. **20**
- Figura 3** - Filogenia bayesiana de γ PLI de serpentes brasileiras da subfamília Crotalinae (Gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus*). As seguintes espécies do Velho Mundo foram incluídas: *Gloydus blomhoffii siniticus* (Viperidae, Crotalinae), *Python reticulatus* (Pythonidae) e *Elaphe quadrivirgata* (Colubridae) (Estevão-Costa et al., 2008). **27**
- Figura 4** - Perfil cromatográfico do fracionamento do veneno de *C. durissus terrificus* em coluna de gel filtração (Sephacryl S-200). A corrida foi realizada com tampão Tris 50 mM pH 7,4 contendo NaCl 0,1 M em um fluxo de 1,5 mL/min, O veneno foi fracionado em quatro picos (S1, S2, S3 e S4). **38**
- Figura 5** - SDS-PAGE 15% das frações da cromatografia em Sephadryl S-200 do veneno de *C. durissus terrificus*. Vinte μ g de proteínas dos pools da cromatografia Sephadryl-S200 foram submetidos ao SDS-PAGE em condições reduzidas (A) e não reduzidas (B), corados com Coomassie G. Canaletas: Padrão de massa molecular (1), Veneno bruto (2), S1 (3), S2 (4), S3 (5) e S4 (6). **39**
- Figura 6** - A. Perfil cromatográfico da PLA₂ em HPLC de fase reversa em uma coluna semi-preparativa C5 (Discovery® BIO Wide Pore C5 HPLC Column, 10 μ m, 5 x 1 cm). A eluição foi realizada utilizando um volume 40 mL de um gradiente de 0 a 60% de tampão B (66% de acetonitrila em TFA 0,1%), em um fluxo de 1 mL/min. B. SDS-PAGE 12% da PLA₂ eluída do HPLC (2) e padrão de massa molecular (1). **40**
- Figura 7** - Perfil cromatográfico do fracionamento de soro da serpente *B. jararaca* em coluna de troca iônica (DEAE FF). A eluição foi feita, inicialmente, mantendo o tampão A (Tris 25 mM, pH 7,5) e tampão B a 10% (Tris 25mM, NaCl 1M pH 7,5) e em seguida fazendo um gradiente de B até 50% (NaCl 500mM), com fluxo de 1 mL/min. A280 (linha azul) e concentração de B (linha verde). **41**
- Figura 8** - Perfil cromatográfico de eluição das frações do pool D2 em coluna de afinidade (Sephacryl CNBr-ativada + crotoxina). A eluição foi feita com glicina 1M pH 2. **41**
- Figura 9** - Perfil cromatográfico da BjPLI γ em HPLC de fase reversa (C18 Discovery® BIO Wide Pore C18) (HPLC Column, 5 μ m particle size, L×I.D. 25 cm × 4.6mm) com a amostra BjPLI γ . A eluição foi realizada por gradiente de 0 a 66% de acetonitrila em TFA 0,1%, em um fluxo de 1 mL/min. **42**
- Figura 10** - SDS-PAGE 15% das frações da cromatografia em DEAE FF do soro de *B. jararaca*. Por canaleta, foram aplicados 20 μ g de proteínas dos pools da cromatografia

em DEAE FF em condições reduzidas (A) e não reduzidas (B) e os géis foram corados com Coomassie G. Canaletas: Padrão de massa molecular (1), Soro inicial (2), Flow through (3), D1 (4) e D2 (5). 43

Figura 11 - SDS-PAGE 15% das frações eluídas do fracionamento do pool D2 em coluna de afinidade (Sephacrose CNBr-ativada + crotoxina). Vinte µg de proteínas eluídas da cromatografia de afinidade foram aplicadas por canaleta em condições reduzidas (2) e não reduzidas (3), coradas por coloração de prata. Canaletas: Padrão de massa molecular (1) e banda retirada para análise por espectrometria de massas (). 43

Figura 12 - Alinhamento da sequência de aminoácidos do γPLI de *B. jararaca* (A8I4L6_BOTJA) com os peptídeos adquiridos por espectrometria de massas da banda retirada do SDS-PAGE (BjPLIγ). Os 16 resíduos de cisteína estão sendo indicados em vermelho, os 3 possíveis sítios de fosforilação estão sendo indicados em azul e o possível sítio de N-glicosilação está indicado em verde. O oligopeptídeo ¹⁰⁴QPFPGPLPSRPNGYY¹¹⁸ encontra-se circundado por um retângulo. O símbolo (*) indica os resíduos de aminoácidos iguais entre as sequências; (.) indica mudança de resíduo de aminoácido com natureza diferente. O peptídeo sinal está destacado em cinza. 44

Figura 13 - Espectro do BjPLIγ obtido através da análise por dicroísmo circular referentes aos comprimentos de ondas entre 190 e 260 nm. 45

Figura 14 - Teste de inibição da atividade enzimática da PLA₂ pelo BjPLIγ. Utilizaram-se diferentes doses de BjPLIγ (20 µg, 10 µg, 5 µg, 2,5 µg) e uma dose fixa de PLA₂ (20 µg). As amostras BjPLIγ + PLA₂ foram incubadas por 40 min a 37 °C. Em seguida, o substrato 4N3OBA (1mg/mL) foi adicionado e a reação foi monitorada a A₄₀₅ por 45 min. 46

Figura 15 - Neutralização da atividade miotóxica do BjPLIγ causada pela PLA₂. A PLA₂ (50 µg) foi previamente incubada com BjPLIγ (50 µg) a 37 °C. Em seguida, a mistura foi injetada via intramuscular e a Creatina Quinase (CK) presente no sangue dos camundongos (Swiss) foi quantificada e expressa em U/L. Foram feitos os seguintes controles: PLA₂ (50 µg), BjPLIγ (50 µg) e de solução salina 0,95 % (50 µL). 46

Figura 16 - Neutralização da atividade edematogênica causada pela PLA₂ utilizando o BjPLIγ. Amostras de PLA₂ (10 µg), BjPLIγ (10 µg) e PLA₂ + BjPLIγ (10 µg + 10 µg), previamente incubadas a 37 °C, Foram injetadas na região subplatar da pata direita dos camundongos (Swiss). O volume do edema foi acompanhado, utilizando o hidropletismômetro, até a diminuição da inflamação do controle positivo (PLA₂) chegar a 20% da inicial. Também foi realizado um grupo injetado com solução salina como controle negativo, os valores encontrados foram subtraídos das amostras testes. 47

Figura 17 - Perfil cromatográfico em coluna de exclusão molecular (BioSep SEC S-2000) das amostras PLA₂ (500 µg) e BjPLIγ (500 µg) aplicadas na coluna isoladas e após incubação (PLA₂+BjPLIγ), por 30 min a 37°C. A corrida foi realizada em tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM pH 8,0, em um fluxo de 1 mL/min. 48

Figura 18 - Perfil cromatográfico em coluna C18 (HPLC) das amostras PLA₂ (10 mg) e BjPLI_γ (10 mg) aplicadas na coluna isoladas e após incubação (PLA₂+BjPLI_γ), por 30 min a 37°C **48**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de diferentes PLIs (modificado de Oliveira, 2009).	24
Tabela 2 - Avaliação da atividade fosfolipásica (U/mg/min) dos picos S1, S2, S3 e S4 da cromatografia de gel filtração com veneno de <i>C. durissus terrificus</i>	39
Tabela 3 - Purificação do BjPLI γ a partir do soro da serpente <i>B. jararaca</i>	41
Tabela 4 - Proteínas identificadas com maior porcentagem da cobertura a partir dos peptídeos obtidos da banda retirada do SDS-PAGE (Figura 6) e analisada por espectrometria de massas em Synapt G2 HDMS (Waters).	44

LISTA DE ABREVIATURAS

4N3OBA – ácido 4-nitro-3-octanoyloxybenzóico
A₂₈₀ – Absorbância 280 nm
A₄₂₅ – Absorbância 425 nm
B. jararaca – *Bothrops jararaca*
C. durissus terrificus – *Crotalus durissus terrificus*
CEUAIB – Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan
HDMS – Espectrometria de massas de alta definição
CK – Creatina quinase
cPLA₂ – Fosfolipase A₂ citosólica
DOU – Diário Oficial da União
DP – Desvio padrão
FF – *Fast Flow*
GFP-b – Glufibrinopeptídeo
HPLC – cromatografia líquida de alta performance
iPLA₂ – Fosfolipase A₂ Ca²⁺ independente
LNC – Lista de Doenças de Notificação Compulsória
PAF-AH – Fatores de ativação plaquetária do tipo acetilhidrolases
PLA₂ – Fosfolipase A₂
PLI – Inibidor de fosfolipase
SAV – Soro antiveneno
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SEC – cromatografia de exclusão molecular
Sinan Net – Sistema de Informação de Agravos de Notificação
sPLA₂ – Fosfolipase A₂ secretada
TFA – Ácido Trifluoroacético
Thr – Treonina
Tris – Tris(hidroximetil)aminoametano
αPLI – Inibidor de fosfolipase da classe α
βPLI – Inibidor de fosfolipase da classe β
γPLI – Inibidor de fosfolipase da classe γ

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1.	SERPENTES	16
1.2.	ACIDENTES OFÍDICOS	16
1.3.	GÊNERO BOTHROPS	17
1.4.	FOSFOLIPASES A2	20
1.5.	TERAPIA	21
1.6.	INIBIDORES NATURAIS	21
1.7.	INIBIDORES DE FOSFOLIPASE A2	24
2	OBJETIVOS.....	29
2.1.	OBJETIVO	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1.	VENENOS.....	30
3.2.	PLASMA E SORO	30
3.3.	ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS	30
3.3.1.	PURIFICAÇÃO DA CROTOXINA E DA FOSFOLIPASE A ₂ (PLA ₂)	30
3.3.1.1.	Gel filtração	30
3.3.1.2.	Purificação da Fosfolipase A ₂	31
3.3.2.	Purificação do Inibidor de PLA ₂	31
3.3.2.1.	Cromatografia de Troca Iônica	31
3.3.2.2.	Cromatografia de Afinidade.....	31
3.3.2.3.	Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).....	32
3.4.	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	33
3.4.1.	Dosagem de proteínas.....	33
3.4.2.	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (1D)	33
3.4.2.1.	Coloração por Prata	33
3.4.2.2.	Digestão in gel e Espectrometria de Massas	34
3.4.3.	Análise por cromatografia de exclusão molecular.....	35
3.4.4.	Dicroísmo Circular (CD).....	36
3.5.	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA.....	36
3.5.1.	Atividade Fosfolipásica	36
3.5.2.	Atividade miotóxica.....	37
3.5.3.	Avaliação do edema de pata	37
3.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4	RESULTADOS	38
4.1.	ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS	38
4.1.1.	Purificação da Crototoxina e da PLA ₂	38
4.1.2.	Purificação do inibidor de PLA ₂ (BjPLIγ)	40
4.2.	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	42
4.2.1.	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (1D)	42
4.2.2.	Espectrometria de Massas	43
4.2.3.	Dicroísmo circular	45
4.3.	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA.....	45

4.3.1.	<i>Atividade fosfolipásica</i>	<i>45</i>
4.3.2.	<i>Atividade miotóxica e de edema de pata</i>	<i>46</i>
4.3.3.	<i>Interação da PLA₂ com o BjPLLγ</i>	<i>47</i>
5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS*	55

1 Introdução

1.1. Serpentes

As serpentes, ou ofídios, são vertebrados, tetrápodes e amniotas, possuem a forma do corpo alongada, sem patas e com movimentos ágeis, sendo conhecidas popularmente como “cobras”. Estas compõem a Subordem Serpentes e Ordem Squamata. Por serem animais ectotérmicos dependem do calor externo para efetuar sua termorregulação, tornando sua distribuição geográfica mais abundante em regiões tropicais e temperadas, embora sejam encontradas em quase todo o mundo (MARANGONI et al., 2013, MELGAREJO, 2009).

A Superfamília Colubroidea é a que desperta maior interesse médico por causar sérias intoxicações ao homem e aos animais domésticos. Esta superfamília possui quatro grandes famílias representantes no Brasil, sendo elas a Elapidae, a Colubridae, Dipsadidae e a Viperidae. Dentro dessas, as únicas que possuem a capacidade de produzir toxinas em glândulas especializadas e aparelhos apropriados para inoculá-las, ou seja, são consideradas peçonhentas, são as famílias Elapidae e Viperidae (FRANCO, 2009).

As principais funções dessas toxinas são imobilizar, paralisar e matar a presa, a fim de que a mesma possa ser ingerida de maneira segura (RICHARDS et al., 2012), representando assim uma importante inovação na evolução dos ofídios, permitindo a transição da forma de captura da presa pela ação mecânica da constrição, para a captura da presa com o auxílio da ação química do veneno (ALAPE-GIRON et al., 2008).

1.2. Acidentes ofídicos

No Brasil, os acidentes ofídicos são um importante agravo à saúde desde o período pré-colonial (LUCAS, 2009). Os grupos mais vulneráveis a esse tipo de acidente são os jovens adultos, do sexo masculino e de regiões rurais. O número de casos é tão grande que, em agosto de 2010, de acordo com a Portaria 2472, publicada no Diário Oficial da União (DOU), o Ministério da Saúde sentiu a necessidade de ampliar a Lista de Doenças de Notificação Compulsória (LNC) com a inclusão de mais cinco doenças, entre elas, os acidentes com animais peçonhentos. Nessa lista estão agravos e

eventos de importância para a saúde pública, que devem ser notificados quando houver suspeita e confirmação.

De acordo com as notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan Net), apenas no ano de 2013, os acidentes com espécies do gênero *Bothrops* foram os de maior frequência com 87% (19 583 dos casos), seguidos pelos gêneros *Crotalus* com 8% (1 796 dos casos), *Lachesis* com 4% (903 dos casos) e *Micrurus* com 1% (235 dos casos), sendo que o número de casos pode variar de acordo com a macrorregião.

1.3. Gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* pertence à família Viperidae e possui cerca de 26 espécies no território brasileiro, as mais significativas são aquelas abundantes, de grande distribuição geográfica e com populações importantes em diversas regiões. Entre elas estão as *Bothrops alternatus*, *Bothrops atrox*, *Bothrops erythromelas*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi* e a mais conhecida *Bothrops jararaca* (*B. jararaca*) (MELGAREJO, 2009).

A *B. jararaca*, popularmente conhecida como jararaca, jararaca-preguiçosa ou urutu, trata-se da espécie mais comum na região sudeste, habitando desde o Rio Grande do Sul até o sul da Bahia. Essa espécie possui coloração variável, com comprimento médio de um metro, sobe com facilidade em arbustos e telhados, e ocupa áreas silvestres, agrícolas e urbanas (MELGAREJO, 2009).

Como já descrito na literatura, o acidente botrópico possui ação proteolítica, coagulante e hemorrágica, que são responsáveis pelas manifestações locais, como dor, edema, equimose, sangramento no ponto da picada, enfartamento ganglionar, bolhas e necrose; e as manifestações sistêmicas, como sangramento em ferimentos cutâneos preexistentes e hemorragias à distância (gengivorragias, epistaxes, hematêmese e hematúria). Além disso, podem ocorrer também náuseas, vômitos, sudorese, hipotensão arterial e choque (BRASIL, 2001). Essas atividades são extremamente complexas e podem, usualmente, ser atribuídas a componentes específicos do veneno. No entanto, diferentes toxinas podem atuar sinergicamente e uma única toxina pode apresentar diversas atividades (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009).

Cerca de 90% do peso seco dos venenos é constituído por proteínas, porém, apesar de apresentarem mais de 100 proteínas distintas (SERRANO et al., 2005), essas

pertencem apenas a algumas famílias proteicas, incluindo aquelas com atividade enzimática (serinoproteases, metaloproteases, L-aminoácido oxidases e fosfolipases) e sem atividade enzimática (desintegrinas, lectinas, peptídeos natriuréticos, miotoxinas, toxinas CRISP, fatores de crescimento neural e endotelial, cistatinas e inibidores de proteases do tipo Kunitz) (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; FRY, 2005; JUÁREZ; SANZ; CALVETE, 2004; MARKLAND, 1998; SERRANO et al., 2005). As frações não proteicas são representadas por carboidratos, lipídeos, metais (frequentemente associados às glicoproteínas e às metaloproteases), aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres. Esses venenos são misturas complexas com atividades biológicas diversas, que constituem uma excelente fonte de biomoléculas para o desenvolvimento de novas drogas (SUNTRAVAT; NUCHPRAYOON; PÉREZ, 2010). A função de cada um destes componentes, bem como sua interação no envenenamento humano, ainda não estão totalmente esclarecidas. De acordo com a literatura, a composição dos venenos é resultado de múltiplos fatores e sua variabilidade inerente é geralmente relacionada aos fatores ambientais e ecológicos, e pode ser observada ao nível ontogenético, sexual e geográfico (ZELANIS et al., 2012). A análise do transcriptoma da glândula de veneno de *B. jararaca*, feita por Zelanis et al. (2012), revelou diferenças na composição dos venenos quando comparados indivíduos machos, fêmeas, jovens e adultos (**Figura 1**).

Figura 1 - Representação dos transcritos de toxinas putativas de *B. jararaca*. **MPs**: metaloproteínas; **SPs**: serino proteases; **BPPs**: peptídeos potenciadores de bradicinina; **PLA₂**: fosfolipases A₂; **LAAO**: L-aminoácido oxidases; **CRISPs**: proteínas secretadas ricas em cisteínas; **svVEGF**: fatores de crescimento do endotélio vascular; **svNGF**: fatores de crescimento do nervo (Zelanis et al., 2012).

As serinoproteases contêm um resíduo de serina no sítio ativo, que é estabilizado pela presença de histidina e de ácido aspártico (SERRANO; MAROUN, 2005). Embora homogêneas em suas características estruturais, as serinoproteases de peçonhas podem apresentar uma grande diversidade de perfis farmacológicos, atuando em diversos componentes da cascata da coagulação sanguínea e nos sistemas fibrinolítico e calicreína-cinina (SERRANO; MAROUN, 2005; VILCA-QUISPE et al., 2010).

As metaloproteases são enzimas que dependem de íons metálicos para serem ativadas. Metaloproteases de venenos de serpentes estão associadas à hemorragia, à mionecrose, aos danos ao tecido epitelial e às reações que se manifestam na forma de inflamação ou edema (GOMES et al., 2011; GUTIÉRREZ et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2005).

As fosfolipases são uma superfamília de enzimas que hidrolisam fosfolipídeos e estão presentes em diversos tecidos e secreções pancreáticas de mamíferos, e em venenos de animais (KINI, 1997). Dependendo da posição do sítio de hidrólise na cadeia carbônica dos fosfolipídios, as fosfolipases podem ser classificadas em cinco

diferentes classes: A1, A2, B, C e D (**Figura 2**). Os venenos de serpentes são ricos em fosfolipases do tipo A₂ (PLA₂) que hidrolisam especificamente a posição sn-2 dos fosfolipídios de membrana biológicas e artificiais, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídeos (VAN DEENEN; DE HAAS, 1963).

Figura 2 - Classificação das fosfolipases de acordo com a posição de hidrólise em fosfolipídios.

1.4. Fosfolipases A₂

As PLA₂s (E.C 3.1.1.4) podem ser organizadas em cinco grandes grupos: as fosfolipases A₂ secretadas (sPLA₂), as fosfolipases A₂ citosólicas (cPLA₂), as fosfolipases A₂ Ca²⁺independentes (iPLA₂), os fatores de ativação plaquetária do tipo acetilhidrolases (PAF-AH) e as fosfolipases A₂ lisossomais (BURKE; DENNIS, 2009).

Atualmente, as sPLA₂ são classificadas em quinze grupos, de acordo com suas características bioquímicas e estruturais. As PLA₂s dos venenos das famílias Elapidae e Viperidae pertencem, respectivamente, aos grupos IA e IIA/IIB. Essas proteínas são consideradas as mais importantes super-famílias de proteínas presentes nos venenos de serpentes. Ambos os grupos compartilham uma estrutura conservada e mecanismo catalítico idêntico, mas diferem na posição de uma de suas pontes dissulfeto em suas regiões C-terminais (ARNI, 1996).

As PLA₂s foram as primeiras a serem conhecidas e sua descoberta foi devido à observação de sua ação do suco pancreático de mamíferos e da peçonha de serpentes na hidrólise de fosfatidilcolina. As PLA₂s são enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídios, catalisando especificamente a hidrólise de fosfolipídios na ligação éster do carbono 2 e liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos, em uma reação dependente de cálcio, resultando em inflamação tecidual na região afetada pela picada (DENNIS et al.,

1991; SANTOS-FILHO, 2009). Em geral, possuem massa molecular de 12 a 15 kDa, cerca de 120 resíduos de aminoácidos e sua estrutura é estabilizada por 7 a 8 pontes dissulfeto. O cálcio é um cofator essencial para a catálise, a sua substituição por outros íons bivalentes, como o bário e o cádmio, reduzem significativamente a atividade fosfolipásica (YU, 1993). De acordo com o aminoácido na posição 49, as PLA₂s, podem ser divididas entre PLA₂ Asp-49 e PLA₂ Lys-49, sendo a primeira responsável pela alta atividade catalítica por sua eficiente ligação ao Ca²⁺ como cofator, enquanto a segunda possui baixa ou nenhuma atividade enzimática, porém, sendo extremamente ativa na indução de mionecrose (GUTIÉRREZ et al., 2008).

1.5. Terapia

A principal e mais eficaz terapia para o combate aos efeitos dos venenos é a administração de soro antiveneno (SAV), que deve ser realizada em curto período de tempo após o acidente ofídico, com doses adequadas ao tipo de gravidade (leve, moderada ou grave).

O soro utilizado para tratamento de acidentes com animais peçonhentos é constituído de imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de equinos hiperimunizados com antígenos compostos por venenos das serpentes (LUCAS, 2009). O soro deve ser sempre utilizado por via intravenosa. A soroterapia apresenta um maior potencial terapêutico sobre efeitos sistêmicos do envenenamento, não sendo capaz de combater com eficiência a progressão dos efeitos locais (CARDOSO et al., 2009). Além disso, a soroterapia pode gerar dois tipos de reações, anafiláticas ou de hipersensibilidade tipo I (CUPO et al., 1991). Portanto, é de grande importância o investimento em buscas por novos tratamentos que complementem e/ou sejam uma alternativa ao atual tratamento para neutralizar efeitos biológicos e toxicológicos do veneno (SANTOS-FILHO, 2012).

1.6. Inibidores Naturais

Sabe-se que alguns animais homeotérmicos e a maioria das serpentes peçonhentas (e algumas não peçonhentas) possuem resistência natural contra o envenenamento por serpentes peçonhentas, podendo sobreviver em caso de acidentes com esses animais. A resistência natural encontrada nas serpentes tem sido descrita por quase um século, no entanto, o conhecimento dos mecanismos neutralizantes

responsáveis por essa resistência são ainda relativamente desconhecidos (DEORAS; MHASALKAR, 1963; KELLAWAY, 1931; NOGUCHI, 1909). Evidências experimentais indicam que a resistência natural deve-se às propriedades protetoras do plasma desses animais (PÉREZ et al., 1999).

As anti-hemorraginas são os fatores neutralizantes mais conhecidos que inibem a atividade proteolítica das toxinas, e, conseqüentemente, a hemorragia (OMORI-SATOH et al., 2000; TANIZAKI et al., 1991; WEISSENBERG et al. 1992). Estas proteínas podem ser agrupadas em duas classes, de acordo com suas massas moleculares: de alta (700-1000 kDa) e baixa (52-90 kDa) (CATANESE et al., 1992; FOX et al., 1998; OMORI-SATOH et al., 2000; QI et al., 1994; THWIN et al., 1998). Fatores anti-hemorragicos têm sido isolados dos soros de serpentes peçonhentas, tais como, *Trimeresurus flavoviridis*, *Vipera palaestinae* (OVADIA, 1978), *Agkistrodon contortrix mokasen* (WEINSTEIN et al., 1990), *Crotalus atrox* (WEISSENBERG et al., 1991) e *B. jararaca* (VALENTE et al., 2001) e também da serpente não peçonhenta *Dinodon semicarinatus* (TOMIHARA, Y. et al., 1988). Algumas serpentes são resistentes à toxicidade do próprio veneno por mecanismos diferentes de neutralização; entretanto, esses mecanismos de resistência não estão totalmente elucidados (JOSEPH et al., 2002). As proteínas tipo trombina presentes em alguns venenos das serpentes podem induzir a coagulação sanguínea em mamíferos. Porém, eles não atuam sobre os próprios plasmas, sugerindo um papel protetor no envenenamento destes animais (DENSON, 1976; NAHAS et al., 1983; VIEIRA et al., 2008).

O fator anti-hemorragico Bj46a é um potente inibidor da atividade hemorrágica do veneno de *B. jararaca*, especificamente metaloproteases. Acredita-se que a proteína Bj46a esteja relacionada à resistência das serpentes contra seu próprio veneno e pode ser utilizada como uma ferramenta para o desenvolvimento de um soro antiveneno mais efetivo (VALENTE et al., 2001).

Foi isolado um inibidor da atividade coagulante de trombina (BjI) a partir do sangue da serpente *B. jararaca*, cuja massa molecular da proteína nativa é cerca de 1000 kDa. Entretanto, em SDS-PAGE, apresenta duas cadeias de 109 e 138 kDa, em condições reduzidas, e 150 e 219 kDa, sem redução. Este inibidor prolonga a via intrínseca da coagulação sanguínea, sem alterar a via extrínseca. O BjI inibe especificamente a atividade coagulante da trombina, não afetando outras atividades, como a agregação plaquetária e a atividade amidolítica, sugerindo uma ação bastante específica sobre essa enzima (TANAKA-AZEVEDO et al., 2003). Além do seu papel

na inibição da trombina, o BJI também interage imunologicamente com duas proteínas do veneno de *B. jararaca*, de massas moleculares de 35 e 31 kDa, cujas sequências aminoterminais são similares a outras serinoproteinases de veneno de serpentes já descritas, sugerindo um papel deste inibidor na neutralização de uma parte do veneno. Além disso, proteínas imunologicamente semelhantes ao BJI (*Western blotting*) foram encontradas em plasmas de *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops fonsecai*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararacussu*, *Crotalus durissus collilineatus* e *C. durissus terrificus* e a presença desta substância está relacionada com o tempo de trombina prolongado (DE MORAIS et al., 2008; TANAKA, 2002).

Foram isoladas e caracterizadas duas proteínas envolvidas na hemostasia da *B. jararaca*, o fibrinogênio e a antitrombina, mostrando que o fibrinogênio destes animais, diferentemente do fibrinogênio dos mamíferos, é resistente a ação coagulante do veneno desta serpente (VIEIRA et al., 2008). Ademais, os resultados obtidos nesse estudo mostraram que a antitrombina desta serpente apresenta alta homologia estrutural e funcional com outras antitrombinas descritas previamente de outros animais, sugerindo a grande capacidade de conservação desta molécula durante a evolução (DE MORAIS et al., 2009).

Fatores antineurotóxicos foram purificados do sangue de algumas serpentes das subfamílias Viperinae e Crotalinae, como *Vipera palaestinae* (OVADIA et al., 1977) e *C. durissus terrificus*, respectivamente (FORTES-DIAS et al., 1991b; PERALES et al., 1995). Essas proteínas antineurotóxicas são inibidores de PLA₂s (PLI), que constituem um dos principais componentes de venenos de serpentes e que contribuem para os diferentes efeitos patológicos desses venenos, como neuro- e miotoxicidade, distúrbio hemostático, hemólise, cardiotoxicidade e hipotensão (WARRELL, 1989).

Além dos estudos sobre as propriedades anti-hemorrágicas e anti-neurotóxicas das proteínas do sangue, trabalhos focando fatores com atividades anti-miotóxicas do soro desses animais também têm sido descritos. Thwin et al. (1998) descreveu a atividade anti-mionecrótica dos soros de alguns elapídeos australianos (*Pseudechis australis* e *Notechis scutatus*) e de uma serpente não peçonhenta (*Python reticulatus*) contra a atividade miotóxica do veneno de *Daboia russellii* e suas toxinas PLA₂. Além disso, o soro de *Pseudechis australis* mostrou proteção quase completa contra mionecrose causada pelo seu veneno homólogo (PONRAJ et al., 1996). Uma proteína com atividade inibidora miotóxica da PLA₂ foi isolada do sangue da serpente *Bothrops*

asper (BaMIP). Ela tem sequência homóloga aos PLIs do sangue de *Trimeresurus flavoridis* e *Agkistrodon b. siniticus* (DENSON, 1976; OLIVEIRA et al., 2011).

1.7. Inibidores de Fosfolipase A2

O plasma de serpentes tem se mostrado uma fonte biológica complexa de proteínas com forte potencial biotecnológico, que podem auxiliar tanto na inibição do veneno quanto na produção de outros fármacos importantes. A presença de PLIs em plasma de serpentes vem sendo estudada desde 1976, quando KIHARA encontrou e purificou o primeiro inibidor presente no plasma da serpente *Trimeresurus flavoridis*.

Durante os últimos 20 anos, houve um número crescente de publicações de PLIs no plasma de serpentes (**Tabela 1**). Esses inibidores possuem massas moleculares nativas de 75 a 180 kDa, formados por 3-6 subunidades idênticas ou diferentes, de 20 a 50 kDa (algumas glicosiladas), ligadas não covalentemente. Com base na homologia da sequência de aminoácidos, os PLIs são classificados em três diferentes classes (α PLI, β PLI e γ PLI) que podem ser encontradas concomitantemente no plasma (OHKURA, 1997).

α PLI – são proteínas globulares compostas por subunidades de 20-25 kDa com 147 aminoácidos e um sítio de N-glicosilação. Também possuem similaridade sequencial com o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) das lectinas tipo-C, que pode estar relacionado à atividade de neutralização das PLA₂ (OHKURA ET AL., 1993; LIZANO ET AL., 1997; OLIVEIRA 2008).

β PLI – são glicoproteínas globulares ácidas de 160 kDa, compostas por três subunidades monoméricas de aproximadamente 50 kDa, de 308 aminoácidos e 4 sítios de N-glicosilação por subunidade. Alguns estudos com β PLI purificados a partir do plasma da serpente *Agkistrodon blomhoffii siniticus* indicaram melhor capacidade de neutralização de PLA₂ básicas, enquanto as α PLIs purificadas do mesmo animal possuem maior tendência a neutralizar as PLA₂ ácidas (OKUMURA et al., 1998)

γ PLI – são os inibidores que apresentam o maior número de subunidades proteicas, com massa molecular de 90 a 130 kDa, compostas por 3-6 subunidades de 20-31 kDa, unidas por ligações não covalentes. Esta classe de inibidores é a que está sendo mais comumente encontrada no plasma de serpentes. Sua principal característica estrutural é a repetição comum intermolecular de domínios ricos em cisteína, conhecidos como motivos *three-finger*, tais como os encontrados em proteínas

pertencentes à família Ly-6, do tipo uroquinase ativador de plasminogênio, e α -neurotoxinas (OHKURA et al., 1994a). A classe de inibidores do tipo γ foi recentemente subdividida em I e II, de acordo com sua composição, podendo ser heteroméricas ou homoméricas, respectivamente (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003). Outro dado importante que sustenta a divisão em uma nova subclasse destes inibidores é o fato de que os γ PLIs I possuem a capacidade de inibir todas as classes de PLA₂ de venenos (I, II e III), enquanto as γ PLIs II inibem apenas as PLA₂ da classe II (FORTES-DIAS et al., 1994). Estevão-Costa et al. (2008), usando transcritos, traçou a filogenia de γ PLI das espécies *Bothrops alternatus*, *Bothrops erythromelas*, *B. jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi*. Essas espécies, que são comumente encontradas no Brasil, apresentaram grande similaridade na estrutura primária e secundária. Neste mesmo trabalho, o oligopeptídeo ¹⁰⁴QPFPGGLPLSRPNGYY¹¹⁸ foi identificado em todas as sequências estruturais das espécies do gênero *Bothrops*, sendo considerada a responsável pela interação com as PLA₂s, já que é similar ao decapeptídeo ¹⁰⁷PGLPLSLQNG¹¹⁶ que inibiu a PLA₂ dos grupos I-III, além de PLA₂s sinoviais humanas (THWIN et al., 2000, ESTEVÃO-COSTA et al., 2008).

Tabela 1 - Distribuição de diferentes PLIs (Oliveira, 2009).

Classificação	Família	Espécie	Inibidor	Referência
Alfa	Viperidae	<i>Agkistrodon blomhoffii siniticus</i>	AbsPLI α	(OHKURA et al., 1993)
		<i>Atropoides nummifer</i>	AnMIP	(QUIRÓS et al., 2007)
		<i>Bothrops asper</i>	BaMIP	(LIZANO et al., 1997)
		<i>Bothrops moojeni</i>	BmjMIP	(SOARES et al., 2003)
		<i>Bothrops jararacussu</i>	α BjussuMIP	(OLIVEIRA et al., 2008)
		<i>Cerrophidion godmani</i>	CgMIP-II	(LIZANO et al., 2000)
		<i>Gloydius brevicaudus</i>	GbPLI α	(OKUMURA et al., 2005)
		<i>Protobothrops flavoviridis</i>	PLI α	(SHIMADA et al., 2008)
		<i>Trimesurus flavoviridis</i>	TfPLI α	Kogaki et al., 1989
	Colubridae	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	EgPLI	Okumura et al., 2003
		<i>Elaphe climacophora</i>	PLI α	Shirai et al., 2009
Beta	Viperidae	<i>Agkistrodon blomhoffii siniticus</i>	PLI β	Okumura et al., 1998
	Colubridae	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	EqPLI β	Okumura et al., 2002
		<i>Elaphe climacophora</i>	PLI β	Shirai et al., 2009
Gama	Viperidae	<i>Agkistrodon blomhoffii siniticus</i>	PLI γ	Ohkura et al., 1997
		<i>Bothrops alternatus</i>	PLI γ	Estevão-Costa et al., 2008
		<i>Bothrops erythromelas</i>		
		<i>Bothrops jararaca</i>		
		<i>Bothrops jararacussu</i>		
		<i>Bothrops moojeni</i>		
		<i>Bothrops neuwiedi</i>		
		<i>Bothrops jararacussu</i>	γ BjussuMIP	Oliveira et al., 2008
		<i>Cerrophidion godmani</i>	CgMIP-I	Lizano et al., 2000
		<i>Crotalus durissus terrificus</i>	CNF	Fortes-Dias et al., 1994
			CCS	Perales et al. 1995
		<i>Lachesis muta muta</i>	PLI γ	Fortes-Dias et al., 2003
		<i>Protobothrops flaviridis</i>		So et al., 2008
		<i>Trimesurus flavoviridis</i>	TfPLI γ	Nobushisa et al., 1997
	Boiidae	<i>Phyton reticulatus</i>	PIP	Thwin et al., 2000
	Hydrophidae	<i>Elaphe climacophora</i>	PLI γ	Shirai et al., 2009
		<i>Elaphe quadrivirgata</i>	EqPLI γ	Okumura et al., 1999
	Elapidae	<i>Laticauda semifasciata</i>	LsfPLI γ	Ohkura et al., 1994a,b
		<i>Naja naja kaouthia</i>	NnkPLI γ	Hains et al., 2000
		<i>Notechis ater</i>	NAI	Hains e Broady, 2000
		<i>Notechis ater serventyi</i>	NAsI	Hains et al., 20001
		<i>Notechis scutatus</i>	NSI	Hains e Broady, 2000
		<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	OMI	
		<i>Oxyuranus scutellatus</i>	OSI	
		<i>Pseudonaja textilis</i>	PTI	

Kinkawa e colaboradores (2010) demonstraram que a expressão gênica de α PLI e β PLI no fígado de *Gloydius brevicaudus* é regulada através de indutores que estão presentes no veneno destes animais. Nesse trabalho, o grupo administrou PLA₂

proveniente do próprio veneno, via intramuscular, na serpente, tendo observado o aumento da expressão desses inibidores no soro desses animais.

Figura 3 - Filogenia bayesiana de γ PLI de serpentes brasileiras da subfamília Crotalinae (Gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus*). As seguintes espécies do Velho Mundo foram incluídas: *Gloydius blomhoffii siniticus* (Viperidae, Crotalinae), *Python reticulatus* (Pythonidae) e *Elaphe quadrivirgata* (Colubridae) (Estevão-Costa et al., 2008).

Além da identificação de γ PLI no sangue de animais, tem sido identificada a presença destes inibidores no veneno de serpentes. Nosso grupo identificou a presença deste inibidor no veneno da espécie de serpente *Bothrops moojeni*, e, recentemente, foi encontrado no veneno de *Bothriechis schlegelii* neonatos (AGUIAR, 2016; PLA et al., 2016).

Embora já tenham sido descritos e purificados inibidores de PLA₂ em algumas espécies de serpentes, a PLI da serpente *B. jararaca* só havia sido relatada por Estevão-Costa et. al. (2008) através da transcrição de cDNA de células do fígado. Esse fato, aliado à importância da obtenção de tratamentos alternativos ou mesmo complementares à soroterapia do envenenamento botrópico, motivou-nos a estudar a PLI ao nível proteico, e para isso foi desenvolvido uma metodologia para isolá-lo, utilizando uma proteína, como ligante em uma coluna de afinidade, que é facilmente purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, a partir do soro da serpente *B. jararaca*. Além

disso, características bioquímicas e biológicas da proteína isolada também foram analisadas para verificar o possível potencial terapêutico desse inibidor.

2 Objetivos

2.1. *Objetivo*

O presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar um inibidor de PLA₂ a partir do soro da serpente *B. jararaca*, avaliando também o seu potencial terapêutico.

3 Materiais e Métodos

3.1. Venenos

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi fornecido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. O veneno foi submetido aos procedimentos de rotina já padronizados pelo Laboratório, que compreendem os seguintes passos: obtenção do veneno por extração manual, sendo posteriormente, submetido à centrifugação a 2500 g por 15 min, liofilizado e armazenado a -20 °C até o momento da análise.

3.2. Plasma e soro

O sangue foi coletado por punção via caudal utilizando seringas plásticas; ao sangue foi adicionado uma solução anticoagulante de citrato de sódio 3,8%, numa proporção de nove volumes de plasma para um volume de anticoagulante. Os plasmas foram obtidos pela centrifugação a 1200 g, à temperatura ambiente por 15 min e estocados a -20 °C.

O soro foi preparado de forma semelhante ao plasma, exceto pela ausência do anticoagulante e incubação do sangue por cerca de 10 horas a 5⁰C, para que ocorresse a coagulação sanguínea, anteriormente à centrifugação.

Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (1374/15 CEUAIB).

3.3. Isolamento das proteínas

3.3.1. Purificação da Crotoxina e da Fosfolipase A₂ (PLA₂)

3.3.1.1. Gel filtração

A purificação da crotoxina foi feita, por um protocolo modificado de Landucci et al., (1994), utilizando uma coluna Sephacryl S200HR Hiprep 26/60, com tampão Tris 50 mM pH 7,4, contendo NaCl 0,1 M (tampão A). Foram aplicados 449 mg de veneno de *C. durissus terrificus* em um volume de 2,5 mL de tampão A. A corrida foi mantida em um fluxo de 1,5 mL/min, acompanhada por absorbância a 280 nm (A₂₈₀) e as amostras foram fracionadas a cada 5 mL.

Após a cromatografia, os picos foram agrupados para a formação de quatro *pools*, nomeados e submetidos ao teste de atividade fosfolipásica para ser identificado o *pool* com a proteína crotoxina.

3.3.1.2. Purificação da Fosfolipase A₂

O veneno bruto de *C. durissus terrificus* foi fracionado como descrito por BEGHINI et al., (2000). O veneno liofilizado (45 mg) foi dissolvido em tampão de bicarbonato de amônio (1,0 M; pH 8,0) e centrifugado a 4500 g durante 1 min. Em seguida, o veneno foi submetido à cromatografia de fase reversa em coluna Supelco C5 (0,10 cm x 25 cm), previamente equilibrada com TFA 0,1%. A PLA₂ da *C. durissus terrificus* foi eluída usando um gradiente de 0 a 60% de tampão B (acetonitrila 66% em 0,1% de TFA) em um volume total de 40 mL, com um fluxo de 1 mL/min, com monitorização da A_{280nm}. A PLA₂ purificada foi denominada sPLA₂ e a sua pureza foi avaliada por SDS-PAGE.

3.3.2. Purificação do Inibidor de PLA₂

3.3.2.1. Cromatografia de Troca Iônica

Sete mililitros de soro de *B. jararaca* foram diluídos em 7 mL de tampão Tris 25 mM pH 7,5 (tampão A) e aplicados em uma coluna aniônica (HiTrap DEAE FF GE 5 mL) previamente equilibrada com 95% de tampão A e 5% de tampão B (Tris 25 mM, NaCl 1 M pH 7,5) em um volume de 25 mL. A eluição foi feita, inicialmente, mantendo o tampão B a 10% (NaCl 100 mM) em um volume de 18 mL, e, em seguida, fazendo um gradiente de B até 50% (NaCl 500 mM) em um volume total de 67 mL. A corrida foi mantida em um fluxo de 1 mL/min, acompanhada por A₂₈₀ e as amostras foram fracionadas a cada 5 mL.

Após a cromatografia, as frações proteicas foram agrupadas em *pools*. A dessalinização dos *pools* foi feita por diálise em PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,6 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂ PO₄ 1,7 mM, pH 7,4) durante 15 horas a 4 °C.

3.3.2.2. Cromatografia de Afinidade

A cromatografia de afinidade consiste na interação das proteínas aos seus ligantes específicos. Assim, uma coluna de afinidade foi montada pelo acoplamento da

crotoxina, purificada por gel filtração (item 3.3.1), com a matriz Sepharose CNBr-ativada (GE). O acoplamento foi realizado segundo recomendação do fabricante. Brevemente, iniciou-se pela ressuspensão da resina Sepharose CNBr-ativada em de HCl 1 mM. Esta foi então lavada por 15 min com 200 mL de HCl 1 mM por grama de resina. A matriz foi transferida imediatamente à solução ligante (crotoxina isolada do veneno dissolvido na proporção de 1:2 em NaHCO₃ 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3), permanecendo sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a resina acoplada à crotoxina foi transferida para uma solução de bloqueio (glicina 0,2 M pH 8,0) durante 16 horas à 4 °C, imediatamente após o bloqueio. O excesso de ligante e tampão de bloqueio foram removidos com lavagens alternadas entre tampão de lavagem (acetato de sódio 0,1 M e NaCl 0,5 M pH 4,0) e de acoplamento (NaHCO₃ 0,2 M e NaCl 0,5 M pH 8,3). Este último passo foi repetido 5 vezes. Em seguida, foi realizada a montagem da coluna pelo empacotamento da resina.

Após a montagem da coluna, o *pool* D2 (da cromatografia em HiTrap DEAE FF) foi aplicado à coluna de afinidade previamente equilibrada com PBS. O material não adsorvido foi retirado por extensa lavagem com PBS. Posteriormente, as proteínas adsorvidas à resina foram eluídas com glicina 1M pH 2, fracionadas a cada 1 mL em microtubos e o pH das frações foi neutralizado pela adição de tampão Tris 1M pH 8,8.

3.3.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Após a cromatografia de afinidade, foi realizada uma HPLC de fase reversa usando uma coluna semi-preparativa C5 (Discovery® BIO Wide Pore C5 HPLC Column, 10 µm, 5 x 1 cm), previamente equilibrada com tampão A (TFA 0,1%), durante 15 min. Basicamente, aproximadamente 1 mg de amostra de proteína, obtida a partir da cromatografia de afinidade, foi solubilizado em 400 µL de tampão A e centrifugado a 15000 g durante 5 min e o sobrenadante resultante foi recuperado e aplicado à coluna. A proteína foi eluída por gradiente de 0 a 100% de tampão B (66% de acetonitrila dissolvido em tampão A). O fluxo da corrida foi ajustado para 1 mL/min e a mesma foi monitorada a A₂₈₀. Após esta primeira etapa cromatográfica em uma coluna preparativa C5 de HPLC, a proteína foi submetida a uma nova HPLC de fase reversa em coluna C18 (Discovery® BIO Wide Pore C18 HPLC Column, 5 µm particle size, L×I.D. 25 cm × 4.6 mm). Nesta segunda cromatografia, aproximadamente 10 mg da amostra eluída na cromatografia anterior (em coluna C5) foram dissolvidos em

tampão A (TFA 0,1% em H₂O), e aplicados em coluna C18, previamente equilibrada com o mesmo tampão por 15 min, anteriormente à injeção da amostra. A eluição foi efetuada utilizando um gradiente de 0 a 100% de tampão B (acetonitrila 66% em tampão A). A corrida cromatográfica foi acompanhada a A₂₈₀, com fluxo constante de 1 mL/min. As frações resultantes foram liofilizadas e armazenadas para ensaios bioquímicos e biológicos subsequentes.

3.4. Caracterização bioquímica

3.4.1. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada por A₂₈₀ em leitor de placas (Spectra Max I3) e pelo método de Bradford (“Bio-Rad Protein Assay”), seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante. A determinação da concentração de proteínas foi realizada através de uma curva-padrão, utilizando-se soroalbumina bovina (Sigma) como padrão.

3.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (1D)

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% contendo SDS (SDS-PAGE) (LAEMMLI 1970). Foram aplicados 20 µg de proteína por canaleta em tampão com ou sem β-mercapthoethanol. Os géis de poliacrilamida foram corados utilizando-se Coomassie Brilliant Blue G, de acordo com as recomendações do fabricante (GE) ou corados utilizando-se solução de nitrato de prata (BLUM; BEIER; GROSS, J., 1987).

3.4.2.1. Coloração por Prata

Após a SDS-PAGE, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram fixadas por uma hora em solução contendo etanol 10% e ácido acético 7%. Em seguida, o gel foi lavado em etanol 50% com aquecimento durante 30 segundos em micro-ondas, seguido de incubação por 5 min em temperatura ambiente. Foi realizado então o tratamento prévio do gel utilizando-se solução de tiosulfato de sódio (200 mg/L), durante 30 segundos no micro-ondas e por 2 min em temperatura ambiente. A seguir, o gel foi lavado com água destilada, durante 30 segundos no micro-ondas e por 2 min, em temperatura ambiente, e colocado em solução contendo 1 mL de nitrato de prata 20% e 75 mL de formaldeído 37% em um volume total de 100 mL, durante 30 segundos, no

micro-ondas e por 5 min em temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi lavado novamente com água destilada (duas vezes de 20 segundos) e revelado em solução contendo 30 mL de carbonato de sódio 20%, 75 mL de formaldeído 37% e 0,8 µL de tiosulfato de sódio 50%. Após o aparecimento das bandas, a reação foi interrompida utilizando-se solução contendo metanol 50% e ácido acético 12%.

3.4.2.2. Digestão in gel e Espectrometria de Massas

A banda com massa de 20 kDa, presente no SDS-PAGE 15% (item 3.4.2) da amostra eluída da cromatografia de afinidade em condição reduzida, foi excisada e submetida ao processo de digestão *in gel* segundo o protocolo descrito por HANNA et al. (2000), com modificações.

Inicialmente, o fragmento de gel excisado foi incubado em 500 µL de uma solução de metanol 50% e ácido acético 5% em água deionizada por duas horas. Em seguida, essa solução foi removida e novamente 500 µL desta mesma solução foram adicionados ao fragmento de gel, permanecendo por mais uma hora nesta solução. Daí, o fragmento de gel foi desidratado pela incubação por 10 min (2 vezes de 5 min) em 200 µL de acetonitrila (100%). A solução de acetonitrila foi removida e o restante evaporado em *speed vac*. O fragmento de gel foi então reidratado por 30 min em 30 µL de solução redutora (Ditiotreitol 10 mM em bicarbonato de amônio 100 mM). Após a reidratação, a solução foi removida e o fragmento foi incubado por 30 min em 30 µL da solução alquilante (Iodoacetamida 50 mM em bicarbonato de amônio 100 mM). Seguido pela remoção da solução alquilante e o fragmento de gel foi mantido por 10 min em 100 µL de solução de bicarbonato de amônio 100 mM. Após esta etapa, a solução de bicarbonato de amônio foi removida e 200 µL de acetonitrila 100% foram adicionados e o fragmento incubado por 5 min. A solução de acetonitrila foi removida e, novamente, o fragmento de gel incubado, por 10 min, em 200 µL da solução de bicarbonato de amônio 100 mM. Na última etapa de desidratação, a solução de bicarbonato de amônio foi removida e o fragmento de gel incubado por 10 min (duas vezes de 5 min) em 200 µL de acetonitrila 100%. A solução de acetonitrila foi removida e o restante evaporado em *speed vac*. O fragmento de gel foi reidratado em 40 µL de uma solução de tripsina (20 ng/µL em bicarbonato de amônio 50 mM), em banho de gelo, por 30 min. Em seguida, a solução de tripsina foi removida, uma solução de bicarbonato de amônio 50 mM foi adicionada (em um volume suficiente para cobrir o fragmento de gel) e o tubo contendo o fragmento foi incubado a 37 °C por 18 horas. A

extração dos peptídeos do gel foi feita pela adição de 30 μ L da solução 1 (ácido fórmico 5% em água deionizada) e incubados por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, a solução contendo os peptídeos foi transferida para um novo microtubo e, ao pedaço de gel do tubo anterior, foram adicionados 12 μ L da solução 2 (ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%). O fragmento de gel foi incubado por 20 min (duas vezes de 10 min) nesta solução, que foi transferida para o tubo contendo os peptídeos que foram extraídos com a solução 1 e concentrada em *speed vac*.

Os peptídeos resultantes da digestão anterior foram ressuspensos em 25 μ L de ácido fórmico 0,1%. Aliquotas de 5 μ g dos peptídeos digeridos de cada amostra foram aplicadas em um sistema de cromatografia nanoAcquity UPLC (Waters), acoplado a um espectrômetro de massas Synapt G2 HDMS (Waters). As amostras foram injetadas em uma coluna trap (C18 nanoAcquity trap Symmetry de 180 μ m x 20 mm, Waters) utilizando solução de ácido fórmico 0,1%. As amostras foram eluídas em uma coluna analítica capilar (C18 nanoAcquity BEH 75 μ m x 200 mm, 1,7 μ m) usando um gradiente partindo de 93% de solução A (ácido fórmico 0,1%) e 7% de solução B (acetonitrila 99,9% e ácido fórmico 0,1%) até atingir 35% dessa segunda solução, durante 92 min, em um fluxo de 275 nL/min. Os dados foram adquiridos pelo espectrômetro de massas no modo de aquisição “High Definition Mass Spectrometry” HDMSE, alternando-se os modos de baixa energia (4eV) e de alta energia de colisão com rampa de 19-45 eV a cada 1,25 segundos. O espectrômetro de massas foi calibrado antes do uso, e também durante a corrida analítica, a cada intervalo de 30 seg, utilizando a fonte nanoLockSpray com o peptídeo GFP-b (glufibrinopeptídeo, Waters).

O alinhamento da sequência de aminoácidos obtidas pela análise de espectrometria de massas foi feita no programa Clustalo 1.2.4.

3.4.3. Análise por cromatografia de exclusão molecular

Para realizar a análise por SEC, foram preparadas a PLA₂ de *C. durissus terrificus*, a proteína purificada a partir do plasma de *B. jararaca* (BjPLI γ) e uma solução contendo a PLA₂ incubada, a 37 °C por 40 min, com a BjPLI γ (Massa:Massa; PLA₂ + BjPLI γ), dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6, em concentração final de 1 mg/mL. Utilizou-se um sistema cromatográfico composto por uma coluna de separação analítica SEC à base de sílica (BioSep SEC S-2000 da Phenomenex embalado 5 μ m, 300 x 7,8 mm), mantida a 30 °C, acoplado ao sistema de cromatografia analítica Jasco. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 15 mM,

CaCl₂ 1 mM pH 8, durante 20 min, previamente à injeção de 200 µL de cada uma das amostras. A corrida cromatográfica foi monitorada a A₂₈₀ e o ensaio foi mantido em um fluxo de 1 mL/min. Todas as frações foram recuperadas, liofilizadas e armazenadas para outros testes.

3.4.4. Dicroísmo Circular (CD)

A PLA₂ e a proteína inibidora de PLA₂ (BjPLIγ) foram dissolvidas em tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 7,4) e a concentração de proteína final foi ajustada para 8,7 mM. Após centrifugação a 4000 × g durante 5 min, as amostras foram transferidas para uma cubeta de quartzo de 1 mm de comprimento. Os espectros de dicroísmo circular na região do comprimento de onda UV (185-250 nm) foram adquiridos com um espectropolarímetro J815 (Jasco Corporation, Japão), utilizando uma banda de 1 nm e um tempo de resposta de 1 seg. A coleta de dados foi realizada à temperatura ambiente com uma velocidade de varrição de 100 nm/min. Nove imagens foram obtidas para cada amostra e todos os espectros foram corrigidos subtraindo os tampões.

3.5. Caracterização biológica

3.5.1. Atividade Fosfolipásica

O protocolo utilizado para a dosagem da atividade fosfolipásica foi a metodologia descrita por HOLZER e MACKESSY (1996), com algumas alterações. A atividade de sPLA₂ foi mensurada em placa de 96 poços usando como substrato ácido 4-nitro-3-octanoyloxybenzóico (4N3OBA, Enzy Life Science, USA). Em cada poço, foram adicionados 200 µL de tampão (Tris/HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, e NaCl 100 mM, pH 7,8), 20 µL de substrato 4N3OBA (1 mg/mL em acetonitrila 100%), 20 µL de água e 20 µL de sPLA₂ (20 µg). Em seguida, a reação foi incubada por 40 min a 37 °C, e a sua absorbância a 425 nm (A₄₂₅) foi monitorada em intervalos de 10 min. A atividade enzimática foi calculada com base no aumento da absorbância após 20 min. O efeito da concentração do substrato na atividade da enzima foi determinada através da medição do aumento da absorbância após 20 min de incubação em tampão Tris/HCl,

pH8,0, a 37°C. Todos os ensaios foram realizados através da medição da A_{425} utilizando um leitor de placas SpectraMax.

Para avaliar o potencial inibitório, antes de adicionar o substrato, foram substituídos os 20 µL de água deionizada pelo BjPLIγ e mantido incubado por 40 min em local protegido da luz. As absorbâncias foram transformadas em velocidade de reação do substrato, sob unidade de (nm.25,8 mmol/Tmin). Para calcular a porcentagem de inibição, utilizou-se a velocidade de consumo do substrato (inclinação da reta) sob a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(VoPLA_2 - Vo_{incubados})}{VoPLA_2} \cdot 100$$

3.5.2. Atividade miotóxica

O potencial inibitório da mionecrose foi determinado pela injeção de 50 µL de PLA₂ (50 µg) com BjPLIγ (50 µg), previamente incubados por 30 min a 37 °C, no músculo gastrocnêmio direito de camundongos Swiss (n = 5), machos, pesando entre 18 e 20 g. Os camundongos que foram utilizados como controles receberam 50 µg de PLA₂ (n = 5) ou 50 µg de BjPLIγ (n = 5), respectivamente. Também foi utilizado um grupo controle negativo de solução salina 0,9%, o qual recebeu 50 µL de soro fisiológico (n = 5). O sangue de cada camundongo foi coletado em tubo contendo heparina como anticoagulante. Em seguida, o sangue foi centrifugado e o plasma foi separado. O plasma foi armazenado a 4 °C durante um tempo máximo de 12 h, até o momento do ensaio. A quantidade de creatina-quinase (CK) foi então determinada com 40 µL de plasma incubados com 1 mL do reagente de acordo com o protocolo do kit comercial CK (Bioliquid) durante 3 min a 37 °C. Em seguida, foi realizada a mensuração por $A_{340 \text{ nm}}$ em leitor de microplaca. A atividade resultante foi expressa em U/L.

3.5.3. Avaliação do edema de pata

A avaliação da neutralização do edema de pata foi feita por uma única injeção subplantar, em camundongos Swiss, machos, pesando entre 18 a 20 g, de PLA₂ (10 µg), que foi previamente incubada com BjPLIγ (10 µg), durante 30 min (n = 5). O grupo

controle foi inoculado com 10 µg de BjPLI γ (n = 5), ou com 10 µg de PLA₂ (n = 5) e um outro grupo negativo foi inoculado com solução salina 0,9% (n = 5). Os animais foram anestesiados por inalação de halotano. Os volumes da pata foram medidos utilizando um hidropletismômetro, imediatamente antes da injeção e nos seguintes tempos: 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 min. Os resultados foram expressos como o aumento no volume da pata (mL) subtraindo o volume do grupo salina.

3.6. Análise Estatística

Os valores foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão (DP). Significâncias estatísticas foram determinadas utilizando o teste de ANOVA seguido pelo teste Student–Newman–Keuls. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando “p” foi igual ou inferior a 0,05.

4 Resultados

4.1. Isolamento das proteínas

4.1.1. Purificação da Crotoxina e da PLA₂

O veneno (449 mg) de *C. durissus terrificus* foi fracionado usando uma cromatografia de gel filtração em coluna Sephacryl S200 HR, resultando em quatro picos denominados S1, S2, S3 e S4 (**Figura 4**).

Figura 4 - Perfil cromatográfico do fracionamento do veneno de *C. durissus terrificus* em coluna de gel filtração (Sephacryl S-200). A corrida foi realizada com tampão Tris 50 mM pH 7,4 contendo NaCl 0,1 M em um fluxo de 1,5 mL/min. O veneno foi fracionado em quatro picos (S1, S2, S3 e S4).

A pureza das frações foi analisada através do SDS-PAGE 15% (**Figura 5**). **A fração S3** qual apresentou uma banda majoritária entre 10 e 15 kDa e outra acima de 25 kDa, em condições reduzidas e não reduzidas, respectivamente.

Figura 5 - SDS-PAGE 15% das frações da cromatografia em Sephacryl S-200 do veneno de *C. durissus terrificus*. Vinte µg de proteínas dos *pools* da cromatografia Sephacryl-S200 foram submetidos ao SDS-PAGE em condições reduzidas (A) e não reduzidas (B), corados com Coomassie G. Canaletas: Padrão de massa molecular (1), Veneno bruto (2), S1 (3), S2 (4), S3 (5) e S4 (6).

O pico S3 foi o que apresentou atividade fosfolipásica quando incubado com o substrato sintético 4N3OBA (**Tabela 2**). Portanto, este pico foi acoplado à resina Sepharose CNBr-ativada.

Tabela 2 - Avaliação da atividade fosfolipásica (U/mg/min) dos picos S1, S2, S3 e S4 da cromatografia de gel filtração com veneno de *C. durissus terrificus*.

Pico	Atividade Fosfolipásica (U/mg/min)
S1	1
S2	-
S3	167
S4	-

Sabe-se que a crotoxina é formada por um complexo heterodimérico de 24 kDa, composto por uma subunidade ácida (crotapotina) de aproximadamente 10 kDa e uma subunidade básica (PLA₂) de 14 kDa. Uma vez que a associação entre as duas subunidades não é covalente, ela pode ser facilmente quebrada. Por este motivo a PLA₂ foi isolada facilmente utilizando uma cromatografia de fase reversa para ser utilizada nos testes de inibição (**Figura 6**).

Figura 6 - A. Perfil cromatográfico da PLA₂ em HPLC de fase reversa em uma coluna semi-preparativa C5 (Discovery® BIO Wide Pore C5 HPLC Column, 10 µm, 5 x 1 cm). A eluição foi realizada utilizando um volume 40 mL de um gradiente de 0 a 60% de tampão B (66% de acetonitrila em TFA 0,1%), em um fluxo de 1 mL/min. B. SDS-PAGE 12% da PLA₂ eluída do HPLC (2) e padrão de massa molecular (1).

4.1.2. Purificação do inibidor de PLA₂ (*BjPLIγ*)

O sangue da serpente *B. jararaca* foi coletado em ausência de anticoagulante para que ocorresse a ativação da cascata da coagulação sanguínea e assim fosse possível separar o soro. O soro foi aplicado em uma coluna cromatográfica de troca-iônica DEAE FF (aniônica). Após a lavagem da coluna com o tampão A (Tris 25 mM pH 7,5), contendo 5% de tampão B (Tris 25 mM, NaCl 1 M pH 7,5), a eluição foi realizada utilizando um gradiente de B até 50%. Foram obtidos dois picos, denominados de D1 e D2 (**Figura 7**). Separou-se o pico D2, de acordo com o que já havia sido descrito para a purificação do inibidor de PLA₂, o CNF, na qual utilizaram também uma coluna DEAE para o fracionamento do plasma de *C. durissus terrificus*, obtendo o inibidor no último pico cromatográfico (FORTES-DIAS et al., 1991). O pico D2 foi dialisado e aplicado em coluna de afinidade (crotoxina acoplada à resina Sepharose CNBr-ativada). Em seguida, após lavagem exaustiva das proteínas não adsorvidas à coluna, as proteínas adsorvidas foram eluídas com o aumento da concentração de glicina 1 M pH 2, resultando em apenas um pico (**Figura 8**).

Figura 7 - Perfil cromatográfico do fracionamento de soro da serpente *B. jararaca* em coluna de troca iônica (DEAE FF). A eluição foi feita, inicialmente, mantendo o tampão A (Tris 25 mM, pH 7,5) e tampão B a 10% (Tris 25mM, NaCl 1M pH 7,5) e em seguida fazendo um gradiente de B até 50% (NaCl 500mM), com fluxo de 1 mL/min. A280 (linha azul) e concentração de B (linha verde). Foram feitos pools, nomeados FT (Flow through), D1 e D2.

Figura 8 - Perfil cromatográfico de eluição das frações do pool D2 em coluna de afinidade (Sephacrose CNBr-ativada + crotoxina). A eluição foi feita com glicina 1M pH 2.

De acordo com a tabela de purificação (**Tabela 3**), a fração eluída da cromatografia de afinidade representa 1,19% do total proteico do soro da serpente.

Tabela 3 - Purificação do BjPLI_y a partir do soro da serpente *B. jararaca*.

Etapas	mg (totais)*	Recuperação (%)
Soro Inicial	218	100
D2	103,57	47
Eluído da Afinidade	2,18	1,19

* Dosagem de proteína feita pelo método de Bradford.

Para avaliar o grau de pureza da proteína, a fração eluída da cromatografia de afinidade (BjPLI γ) foi submetida à cromatografia de HPLC de fase reversa em coluna C18 (Discovery® BIO Wide Pore C18 HPLC Column, 5 μ m particle size, L×I.D. 25 cm × 4.6 mm). Nesta cromatografia, o BjPLI γ apresentou alto grau de pureza (**Figura 9**).

Figura 9 - Perfil cromatográfico da BjPLI γ em HPLC de fase reversa (C18 Discovery® BIO Wide Pore C18) (HPLC Column, 5 μ m particle size, L×I.D. 25 cm × 4.6mm) com a amostra BjPLI γ . A eluição foi realizada por gradiente de 0 a 100% de acetonitrila em TFA 0,1%, em um fluxo de 1 mL/min.

4.2. Caracterização bioquímica

4.2.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (1D)

Os perfis eletroforéticos das amostras submetidas às cromatografias de troca iônica e de afinidade foram analisados através do SDS-PAGE 15% (**Figura 10 e 11**), no qual a amostra eluída da cromatografia de afinidade apresentou uma única banda em torno de 20 kDa em condição não reduzida, porém em condição reduzida esta banda majoritária apresentou massa em torno de 25 kDa (**Figura 11**).

Figura 10 - SDS-PAGE 15% das frações da cromatografia em DEAE FF do soro de *B. jararaca*. Por canaleta, foram aplicados 20 µg de proteínas dos *pools* da cromatografia em DEAE FF em condições reduzidas (A) e não reduzidas (B) e os géis foram corados com Coomassie G. Canaletas: Padrão de massa molecular (1), Soro inicial (2), *Flow through* (3), D1 (4) e D2 (5).

Figura 11 - SDS-PAGE 15% das frações eluídas do fracionamento do *pool* D2 em coluna de afinidade (Sephacrose CNBr-ativada + crotoxina). Vinte µg de proteínas eluídas da cromatografia de afinidade foram aplicadas por canaleta em condições reduzidas (2) e não reduzidas (3), coradas por coloração de prata. Canaletas: Padrão de massa molecular (1) e banda retirada para análise por espectrometria de massas (□).

4.2.2. Espectrometria de Massas

A banda foi retirada do gel e analisada por espectrometria de massas, e a sequência parcial de aminoácidos adquiridas do BjPLIγ apresentou cobertura de 72%, 68%, 41% e 24% das sequências de aminoácidos de proteínas descritas como γPLI, depositadas no banco de dados, após a análise transcriptômica do fígado de serpentes. As duas proteínas que apresentaram maior similaridade foram identificadas como sendo da espécie *B. jararaca*, seguida por uma de *Bothrops moojeni* e uma de *Protobothrops elegans* (**Tabela 3**). A sequência de peptídeos adquiridas por espectrometria de massas do BjPLIγ foi alinhada com a sequência de peptídeos do A8I4L6_BOTJA (**Figura 12**), γPLI de *B. jararaca* presente no banco de dados, que apresentou maior cobertura de peptídeos. A análise demonstrou que as duas sequências de aminoácidos possuem alta similaridade, com a mudança de apenas dois aminoácidos, uma arginina (BjPLIγ) por uma glicina (A8I4L6_BOTJA), na posição 71, e uma asparagina (BjPLIγ) por glicina (A8I4L6_BOTJA), na posição 145.

Tabela 4 - Proteínas identificadas com maior porcentagem da cobertura a partir dos peptídeos obtidos da banda retirada do SDS-PAGE (Figura 6) e analisada por espectrometria de massas em Synapt G2 HDMS (Waters).

Banda	Proteína	Cobertura	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos
	A8I4L6 A8I4L6_BOTJA	72 %	Gamma-phospholipase A2 inhibitor OS = <i>Bothrops jararaca</i>	22 070	19
	A8I4M0 A8I4M0_BOTJA	68 %	Gamma-phospholipase A2 inhibitor OS = <i>Bothrops jararaca</i>	22 197	19
	A8I4N5 A8I4N5_BOTMO	41 %	Gamma-phospholipase A2 inhibitor OS = <i>Bothrops moojeni</i>	22 181	12
	D9N4B9 D9N4B9_PROEL	24 %	Gamma-phospholipase A2 inhibitor OS = <i>Protobothrops elegans</i>	22 148	5

Figura 12 - Alinhamento da sequência de aminoácidos do γ PLI de *B. jararaca* (A8I4L6_BOTJA) com os peptídeos adquiridos por espectrometria de massas da banda retirada do SDS-PAGE (BjPLI γ). Os 16 resíduos de cisteína estão sendo indicados em vermelho, os 3 possíveis sítios de fosforilação estão sendo indicados em azul e o possível sítio de N-glicosilação está indicado em verde. O oligopeptídeo ¹⁰⁴QPFPGGLPLSRPNGYY¹¹⁸ encontra-se circundado por um retângulo. O símbolo (*) indica os resíduos de aminoácidos iguais entre as sequências; (.) indica mudança de resíduo de aminoácido com natureza diferente. O peptídeo sinal esta destacado em cinza.

```

BjPLI $\gamma$       -----RSCDFCHNIGKDCDGYQQECSSPEDVCGKVFLEISSASLSV
A8I4L6_BOTJA MKSLHTICLLFIFVARGNSRSCDFCHNIGKDCDGYQQECSSPEDVCGKVFLEISSASLSV
                *****

BjPLI $\gamma$       RTVHKNCFSSSICKLGQIDVNIGHHSYIRGRINCCCEKEPCEDQPFPGGLPLSRPNGYYCPG
A8I4L6_BOTJA RTVHKNCFSSSICKLGQIDVNIGHHSYIRGGINCCCEKEPCEDQPFPGGLPLSRPNGYYCPG
                *****

BjPLI $\gamma$       ALGLFTEDSTEYEAI*CHGTETKCIDIVGHRHEHFPGDIAYNLKN-----
A8I4L6_BOTJA ALGLFTEDSTEYEAI*CHGTETKCIDIVGHRHEHFPGDIAYNLKGCVSSCPLLSLSNATHE
                *****

BjPLI $\gamma$       ----YLQKVECK-----
A8I4L6_BOTJA ENRNYLQKVECKDAIRLASL
                *****

```

4.2.3. Dicroísmo circular

A BjPLI γ foi submetida ao dicroísmo circular, o qual apresentou grande quantidade de alfa-hélices (26,3%) e estruturas aleatórias (34,5%), seguido por folha beta pregueada (18,5%) (**Figura 13**).

Figura 13 - Espectro do BjPLI γ obtido através da análise por dicroísmo circular referentes aos comprimentos de ondas entre 190 e 260 nm.

4.3. Caracterização biológica

4.3.1. Atividade fosfolipásica

Para confirmar que havia inibição ou interação entre o BjPLI γ e a PLA₂ foi feito inicialmente o teste *in vitro*. Neste teste, foi possível notar que a BjPLI γ é capaz de inibir o PLA₂ de modo dose dependente (**Figura 14**). A maior porcentagem de inibição foi de 40% (1:1; PLI_B: PLA₂).

Figura 14 - Teste de inibição da atividade enzimática da PLA₂ pelo BjPLI γ . Utilizaram-se diferentes doses de BjPLI γ (20 μ g, 10 μ g, 5 μ g, 2,5 μ g)(PLI_BJ) e uma dose fixa de PLA₂ (20 μ g). As amostras BjPLI γ + PLA₂ foram incubadas por 40 min a 37 °C. Em seguida, o substrato 4N3OBA (1mg/mL) foi adicionado e a reação foi monitorada a A₄₀₅ por 45 min.

4.3.2. Atividade miotóxica e de edema de pata

Após a confirmação de inibição *in vitro*, iniciaram-se os testes *in vivo* (edema e miotoxicidade). O BjPLI γ foi capaz de diminuir significativamente tanto o edema quanto o efeito miotóxico da PLA₂. Nas **figuras 15 e 16**, é possível notar que o BjPLI γ também induziu mionecrose, bem como edema. No entanto, após a incubação prévia com a PLA₂, o BjPLI γ foi capaz de reduzir significativamente a miotoxicidade causada pela PLA₂.

Figura 15- Neutralização da atividade miotóxica do BjPLI γ (PLI_BJ) causada pela PLA₂. A PLA₂ (50 μ g) foi previamente incubada com BjPLI γ (50 μ g) a 37 °C. Em seguida, a mistura foi injetada via intramuscular e a Creatina Quinase (CK) presente no sangue dos camundongos (Swiss) foi quantificada e expressa em U/L. Foram feitos os seguintes controles: PLA₂ (50 μ g), BjPLI γ (50 μ g) (PLI_BJ) e de solução salina 0,95 % (50 μ L).

*Dados estatisticamente significativos em relação ao grupo controle positivo (PLA₂).

Figura 16 - Neutralização da atividade edematogênica causada pela PLA₂ utilizando o BjPLI γ (PLI_BJ). Amostras de PLA₂ (10 μ g), BjPLI γ (10 μ g) e PLA₂ + BjPLI γ (10 μ g + 10 μ g), previamente incubadas a 37 °C, foram injetadas na região subplantar da pata direita dos camundongos (Swiss). O volume do edema foi acompanhado, utilizando o hidropletismômetro, até a diminuição da inflamação do controle positivo (PLA₂) chegar a 20% da inicial. Também foi realizado um grupo injetado com solução salina como controle negativo, os valores encontrados foram subtraídos das amostras testes.

*Dados estatisticamente significativos em relação ao grupo controle positivo (PLA₂).

4.3.3. Interação da PLA₂ com o BjPLI γ

A análise por SEC mostrou que o BjPLI γ aparece como uma única fração, assim como a PLA₂. Além disso, é possível observar que a PLA₂ e a BjPLI γ formam um complexo heterodimérico, que é eluído com massa molecular estimada em 35 kDa, aproximadamente (**Figura 17**). Porém, este complexo não pode ser observado por HPLC (**Figura 18**) de fase reversa. Ambos os resultados sugerem fortemente que a estabilidade do complexo molecular foi mantida por interação molecular fraca e que envolveu a interação hidrofóbica, facilmente rompida pelo HPLC de fase reversa.

Figura 17 - Perfil cromatográfico em coluna de exclusão molecular (BioSep SEC S-2000) das amostras PLA₂ (500 µg) e BjPLIγ (500 µg) (PLI_BJ) aplicadas na coluna isoladas e após incubação (PLA₂+BjPLIγ), por 30 min a 37°C. A corrida foi realizada em tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM pH 8,0, em um fluxo de 1 mL/min.

Figura 18 - Perfil cromatográfico em coluna C18 (HPLC) das amostras PLA₂ (10 mg) e BjPLIγ (10 mg) (PLI_BJ) aplicadas na coluna isoladas e após incubação (PLA₂+BjPLIγ), por 30 min a 37°C .

5 Discussão

Esse trabalho mostra, pela primeira vez, a purificação e caracterização de um γ PLI a partir do sangue da serpente *B. jararaca*, principal causadora dos acidentes ofídicos no Brasil.

Sabe-se que os PLIs apresentam características típicas de cada grupo e que o grupo dos γ PLIs apresentam regiões altamente conservadas (OHKURA et al., 1994; OHNO et al., 1998). Assim, como o trabalho de Oliveira e colaboradores (2011) haviam obtido resultados positivos de interação e inibição entre a crotoxina e dois PLIs, purificados a partir do plasma da serpente *Bothrops jararacussu*, em testes *in vivo* e *in vitro*, optou-se pelo uso da crotoxina como ligante para a montagem da coluna de afinidade, uma vez que trata-se de uma proteína majoritária do veneno de *C. durissus terrificus*, a crotoxina (PLA₂ + crotapotina) corresponde a mais de 60% da composição desse veneno (VITAL-BRAZIL, 1972).

A crotoxina foi isolada por uma cromatografia de gel filtração, em uma Sephacryl S-200, que resultou em 4 picos, em seguida, foram feitas *pools* das frações de cada pico e estes foram denominados S1, S2, S3 e S4. Para confirmar qual *pool* continha crotoxina, utilizou-se um teste de atividade fosfolipásica com o substrato 4N3OBA, e, de acordo com o resultado, a fração S3 possuía a maior e era praticamente a única com atividade fosfolipásica significativa (167 U/mg/min). Para a avaliação da inibição da atividade fosfolipásica usando a proteína BjPLI γ , foi necessário a purificação da fração básica (PLA₂) da crotoxina, retirando a crotapotina, que, por muitos autores é descrita como minimizador da atividade enzimática deste complexo (BON et al., 1989; DOS SANTOS et al., 2005).

Geralmente, para conseguir a separação de um único componente de uma amostra complexa (plasma, por exemplo) é necessária a utilização da combinação de diferentes técnicas metodológicas (TANAKA, 2002). Por isso, neste trabalho, utilizando o soro de *B. jararaca* como matéria prima, foram necessários dois passos cromatográficos para a purificação do PLI.

O primeiro fracionamento do soro, feito em uma coluna DEAE FF, resultou em três *pools*, sendo eles, o *flow through*, o qual contém todas as proteínas com carga positiva e neutras que não se ligaram à resina, e os *pools* D1 e D2, os quais são compostos por proteínas com carga negativa que foram capazes de se ligar à coluna. A eluição dos dois *pools* foi realizada através de um gradiente de NaCl. O *pool* D2 foi consequentemente aplicado à cromatografia de afinidade contendo a crotoxina.

Outros trabalhos já utilizaram cromatografia de afinidade para purificar inibidores de PLA₂ (GIMENES et al., 2014; LIZANO et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2011). Embora a proteína acoplada à coluna (crotoxina) fosse de uma espécie de serpente diferente das proteínas que estavam presentes no *pool* D2, a cromatografia mostrou-se eficiente, sendo possível recuperar 1,19% das proteínas do soro aplicadas inicialmente. No entanto, este valor foi inferior ao obtido por Gimenes (2014), que recuperou 2,60% de γ CdcPLI do plasma da espécie *Crotalus durissus collineatus*. Pode-se sugerir que a variação nestes valores pode ser ocasionada pelas diferenças metodológicas e, principalmente, por uma variabilidade na quantidade de PLI por espécie e/ou individual, que, como a maioria das proteínas plasmáticas apresentam significativa variação individual inerente, ou seja, faz parte do fenótipo, provavelmente o mesmo deva ocorrer com as PLIs. Além disso, Kinkawa (2010) mostrou que a exposição das serpentes às PLA₂s de venenos resultam num aumento de PLIs no sangue desses animais. Assim, não podemos afirmar que todas as serpentes que foram selecionadas para o *pool* de sangue inicial tiveram os mesmos níveis de exposição à PLA₂ do seu próprio veneno ou de uma outra serpente.

O grau de pureza do BjPLI γ foi determinado por HPLC e SDS-PAGE 15%, os quais possibilitaram a determinação da massa molecular relativa de 20 kDa em condições não reduzidas e 25 kDa em condições reduzidas. O valor de 20 kDa do BjPLI γ é corroborado pelo resultado obtido através da dedução da estrutura primária e secundária de PLI transcritos (Estevão-Costa et al., 2008). Sendo assim, os monômeros da PLI purificados neste trabalho são menores do que os isolados de *Crotalus durissus colilineatus* (γ CdcPLI - 30 kDa), *Bothrops jararacussu* (γ BjussuMIP - 23k Da) e *Bothrops moojeni* (α BmjMIP - 23-25 kDa), e similar aos de *Cerrophidion godmani* (CgMIP-I e CgMIP-II - 20-25 kDa) (FORTES-DIAS et al., 1991; GIMENES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2011; SOARES et al., 2003; Z. OLIVEIRA et al., 2011).

A diferença encontrada no valor das massas, em diferentes condições (com e sem β -mercaptoetanol), também foi relatada por Soares et al. (2003), que sugere que os oligômeros destas proteínas são estabilizados através de interações não covalentes, e que cada subunidade possui pontes dissulfetos internamente, explicando o fato de que a migração pode ter sido dificultada pela linearização da proteína (em condições reduzidas), e, em condições não reduzidas o enovelamento foi mantido, facilitando a migração pelo gel.

A proteína eluída pela cromatografia de afinidade só foi identificada como BjPLI γ após digestão, análise por espectrometria de massas e comparação com o banco de dados. A sequência parcial determinada desse inibidor corresponde a 72% e 62% de cobertura de peptídeos em γ PLI da espécie *B. jararaca*, e 42% de cobertura ao γ PLI da *B. moojeni* que foram depositadas no banco de dados pelo grupo de Forte-Dias (2003). Mas podemos considerar que a porcentagem de cobertura de peptídeos foi maior, pois a sequência do γ PLI no banco de dados é de uma proteína transcrita que possui a sequência do peptídeo sinal, que corresponde a 19 aminoácidos (cerca de 10% da proteína madura – 183 aminoácidos), ou seja, considerando a proteína madura, a cobertura é de 85%. Com o alinhamento das duas estruturas de peptídeos, BjPLI γ e A8I4L6_BOTJA, podemos considerar que a sequência de aminoácidos é altamente semelhante, sendo que a sequência do BjPLI γ apresentou somente duas substituições, de uma arginina (BjPLI γ) por uma glicina (A8I4L6_BOTJA), na posição 71, e uma asparagina (BjPLI γ) por glicina (A8I4L6_BOTJA), na posição 145.

Com os resultados adquiridos até o momento, e algumas informações encontradas na literatura, é possível fazer algumas considerações sobre a estrutura do BjPLI γ . Um ponto importante é a glicosilação da proteína, que ocorre em algumas proteínas não citoplasmáticas para facilitar o reconhecimento celular e adesão. A N-glicosilação ocorre apenas nos motivos Asn-Xaa-Ser/Thr, em que Xaa é qualquer aminoácido, com exceção da prolina. Neste tipo de glicosilação, um oligossacarídeo inteiro, contendo 14 resíduos de açúcares, é adicionado à cadeia lateral do aminoácido. De acordo com a estrutura encontrada no banco de dados, é possível que haja este sítio de glicosilação na posição 176, porém o peptídeo que contém esta posição ainda não foi identificado em nossa análise. Oliveira (2011) previu os sítios de γ PLI utilizando o programa *gene runner*, e, de acordo com este trabalho, os sítios de fosforilação de inibidores do tipo γ em *B. jararaca* ocorrem nas posições 21 (Ser), 22 (Ser) e 111 (Thr). Estevão-Costa et al. (2008) sugere que estes sítios de fosforilação estão presentes não só em serpentes *B. jararaca*, mas em todas as espécies analisadas do gênero *Bothrops*, indicando que estas moléculas, provavelmente, podem desempenhar outros papéis fisiológicos, além da inativação de PLA₂, porém este papel ainda não foi descrito.

Outro dado importante relatado no estudo de Estevão-Costa et al. (2008) é a presença do oligopeptídeo ¹⁰⁴QPFGLPLSRPNGYY¹¹⁸ em todos os transcritos analisados do gênero *Bothrops* e importante na interação e inibição da PLA₂. Neste estudo, foi possível confirmar a presença deste oligopeptídeo no BjPLI γ . Tal sequência

é similar ao decapeptídeo P-BII ($^{107}\text{PGLPLSQNG}^{116}$) que está sendo sintetizado e atua na inibição da atividade enzimática *in vitro* da PLA₂.

A interação entre o BjPLI γ e a PLA₂ foi analisada por SEC, e mostrou que, quando incubadas, estas aparecem como uma única fração de cerca de 35 kDa. Além disso, é possível observar que a PLA₂ e a BjPLI γ formam um complexo heterodimérico. Porém, o fato do complexo não ter sido observado por HPLC de fase reversa sugere fortemente que a estabilidade do complexo molecular seja mantida por interação molecular fraca e que pode ser devido à interação hidrofóbica, que pode ser facilmente rompida durante a cromatografia pelo HPLC de fase reversa, devido às condições drásticas de tal metodologia (uso de solventes orgânicos).

A PLA₂ isolada foi incubada com diferentes concentrações de BjPLI γ e analisada usando o substrato sintético 4N3OBA. Tal experimento resultou em um gráfico que mostra a ação inibitória da PLI sobre atividade enzimática da PLA₂ de maneira dose dependente. O mesmo já havia sido relatado por Oliveira et al. (2011), que mostrou a inibição da PLA₂ de *C. durissus terrificus* em 40% utilizando o γ BjussuMIP.

Uma vez que houve inibição da atividade fosfolipásica *in vitro*, decidiu-se analisar se o mesmo ocorria *in vivo*. Assim, realizou-se o teste de edema de pata em camundongos. O BjPLI γ e a PLA₂, após incubação, foram injetados na região subplantar da pata de 3 grupos de camundongos. A partir desse experimento foi possível observar que, além da PLA₂, o BjPLI γ sozinho também induziu certo nível de edema, mas isso pode estar relacionado com a perturbação física da inoculação de amostras “estranhas” no organismo do camundongo. Contudo, o BjPLI γ foi capaz de diminuir significativamente o edema causado pela PLA₂ ao longo do tempo. Comparando com a literatura, o γ BjussuMIP foi capaz de inibir mais eficientemente a atividade edematogênica de PLA₂ do tipo Asp49 do que do tipo Lys49 (80% da Asp49-PrTX-III, 77% da Asp49-BthTX-II, 50% da Lys49-PrTX-I e 45% da Lys49-BthTX-I), enquanto o α BjussuMIP inibiu mais eficientemente as do tipo Lys49 (93% da Lys49-BthTX-I, 91% da Lys49-PrTX-I, 45% da Asp49PrTX-II e Asp49—BthTX-II (OLIVEIRA et al., 2011).

A inibição da miotoxicidade foi testada pela dosagem de creatinina quinase. Os resultados foram semelhantes aos do edema de pata, mostrando que o BjPLI γ reduziu significativamente (50%) o dano causado pela PLA₂ em células musculares, e teve melhor capacidade de inibição quando comparado ao γ CdcPLI, que inibiu apenas cerca de 27% da PLA₂ BnSP-7 (GIMENES et al., 2014).

Por este trabalho ter sido utilizado apenas a PLA₂ presente na crotoxina, que é do grupo das PLA₂ que possuem uma Asp na posição 49, não se pode afirmar que o BjPLI γ possui uma maior eficiência na inibição destas proteínas em relação às que possuem Lys na posição 49. Assim, outros trabalhos deverão ser realizados, a fim de elucidar o comportamento deste inibidor frente às diferentes isoformas das PLA₂s. Porém, considerando que a PLA₂ de mamíferos com atividade pró-inflamatórias estão presentes no mesmo grupo (II) de PLA₂ de venenos de serpentes, um estudo mais detalhado sobre este inibidor pode levar ao desenvolvimento de um modelo mais adequado e potente de inibidores, não apenas para PLA₂ de venenos de serpentes, mas também inibidores para PLA₂ humanas. Desta forma, este trabalho contribuiu na obtenção de uma PLI a partir do sangue da *B. jararaca* capaz de inibir a atividade da PLA₂ tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo um potencial candidato para o uso na terapia do envenenamento botrópico ou mesmo em modelos de estudo para a elucidação dos mecanismos de envenenamento das PLA₂ de serpentes.

6 Conclusão

- No presente trabalho foi isolado e caracterizado alguns aspectos biológicos e bioquímicos do primeiro γ PLI do plasma da serpente *Bothrops jararaca*, denominado BjPLI γ .
- O BjPLI γ foi isolado através de dois passos cromatográficos: uma troca iônica (DEAE FF), seguida de afinidade (Sepharose CNBr-ativada + crotoxina). Esses dois passos foram suficientes para a obtenção da proteína pura, o que foi comprovado através do perfil cromatográfico em HPLC, SEC e SDS-PAGE.
- A massa determinada pelo SDS-PAGE foi de 20 kDa em condição não reduzida, porém em condição reduzida apresentou em torno de 25 kDa.
- A análise por espectrometria de massas confirmou a similaridade entre a estrutura do BjPLI γ e outros γ PLI depositados no banco de dados.
- O BjPLI γ mostrou a capacidade de inibir a ação *in vitro* (teste enzimático) e *in vivo* (miotoxicidade e edema) da PLA₂.

*Referências**

- AGUIAR, W. D. S. **Estudo e caracterização bioquímica e biológica do veneno da serpente Bothrops moojeni e mecanismo antiveneno do plasma desses animais.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.
- ALAPE-GIRON, A. et al. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper* : Geographic , Individual , and Ontogenetic Variations. p. 3556–3571, 2008.
- ARNI, R. K; WARD, R. J., Phospholipase A2-A structural review. **Toxicon**. 34, 827-841, 1996.
- BEGHINI, D. G. et al. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (Maracambóia) venom. **Journal of protein chemistry**, v. 19, n. 7, p. 603–607, out. 2000.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, J., H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93–99, 1987.
- BON, C. et al. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta physiologica et pharmacologica latinoamericana : organo de la Asociacion Latinoamericana de Ciencias Fisiologicas y de la Asociacion Latinoamericana de Farmacologia**, v. 39, n. 4, p. 439–448, 1989.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE - FUNASA. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. 2º ed ed. Brasília. 2001.
- BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of lipid research**, v. 50 Suppl, n. Suppl, p. S237-242, abr. 2009.
- CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics . Strategy and applications. n. July, p. 1405–1414, 2007.
- CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2 ed ed. São Paulo: Sarvier, 2009.
- CATANESE, J. J.; KRESS, L. F. Isolation from opossum serum of a metalloproteinase inhibitor homologous to human alpha 1B-glycoprotein. **Biochemistry**, v. 31, p. 410–418, 1992.
- CUPO, P. et al. Reações de Hipersensibilidade imediatas após uso intravenoso de soros antivenenos: valor prognóstico dos testes de sensibilidade intradérmicos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 33(2), p. 115–122, 1991.
- DE MORAIS, K. B. et al. Bothrops jararaca antithrombin: isolation, characterization and comparison with other animal antithrombins. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 152, n. 2, p. 171–176, fev. 2009.
- DE MORAIS, K. B.; FERNANDES GREGO, K.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Identification of proteins similar to Bothrops jararaca coagulation inhibitor (BjI) in the plasmas of *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararacussu* and *Crotalus durissus terrificus* snakes. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 149, n. 2, p. 236–240, fev. 2008.

DENNIS, E. A et al. Role of phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction. **FASEB**, p. 2068–2077, 1991.

DENSON, K. W. The clotting of a snake (*Crotalus viridis Helli*) plasma and its interaction with various snake venoms. **Thrombosis and haemostasis**, v. 35, n. 2, p. 314–323, abr. 1976.

DEORAS, P. J.; MHASALKAR, V. B. Antivenin activity of some snake sera. **Toxicon**, v. 1, n. 2, p. 89–90, mar. 1963.

DOS SANTOS, R. M. M. et al. Inhibition of crotoxin binding to synaptosomes by a receptor-like protein from *Crotalus durissus terrificus* (the South American rattlesnake). **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1717, n. 1, p. 27–33, 2005.

ESTEVAO-COSTA, M. I. et al. Prospection, structural analysis and phylogenetic relationships of endogenous γ -phospholipase A2 inhibitors in Brazilian Bothrops snakes (Viperidae, Crotalinae). **Toxicon**, v. 52, n. 1, p. 122–129, 2008.

FORTES-DIAS, C. L. et al. Purification and properties of an antivenom factor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v. 29, n. 8, p. 997–1008, 1991.

FORTES-DIAS, C. L.; BARCELLOS, C. J.; ESTEVAO-COSTA, M. I. Molecular cloning of a γ -phospholipase A2 inhibitor from Lachesis muta muta (the bushmaster snake). **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 909–917, jun. 2003.

FOX, J. W.; BJARNASON, J. B. Metalloproteinase inhibitors. In: **Enzymes from snake venoms**. Fort Colli ed. [s.l: s.n.]. p. 559–632, 1998.

FRANÇA, F. O. DE S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente Botrópico. In: **Animais Peçonhentos no Brasil**. 2º ed. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 540.

FRANCO, F. L. Origem e Diversidade das Serpentes. In: **Animais Peçonhentos no Brasil**. 2º ed. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 540.

FRY, B. G. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome research**, v. 15, n. 3, p. 403–420, mar. 2005.

GIMENES, S. N. C. et al. Isolation and biochemical characterization of a γ -type phospholipase A2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. **Toxicon**, v. 81, p. 58–66, 2014.

GOMES, M. S. R. et al. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative**

biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP, v. 153, n. 3, p. 290–300, abr. 2011.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 80–92, 2008.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 54, n. 7, p. 958–975, dez. 2009.

HANNA, S. L. et al. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microbiology**, v. 146, n. 10, p. 2495–2508, 1 out. 2000.

HOLZER, M.; MACKESSY, S. P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 34, n. 10, p. 1149–1155, out. 1996.

JOSEPH, J. S. et al. Effect of snake venom procoagulants on snake plasma: implications for the coagulation cascade of snakes. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 40, n. 2, p. 175–183, fev. 2002.

JUÁREZ, P.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake venomomics: characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. **Proteomics**, v. 4, n. 2, p. 327–338, fev. 2004.

KELLAWAY, C. H. The Immunity of Australian Snakes to Their Own Venoms. . 1931, p. 35–52.

KIHARA, H. Studies on phospholipase A in *Trimeresurus flavoviridis* venom. III. Purification and some properties of phospholipase A inhibitor in Habu serum. **Journal of biochemistry**, v. 80, n. 2, p. 341–349, ago. 1976.

KINI, R. M., Phospholipase A2—a complex multifunctional protein puzzle. **Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. p. 01–28, 1997.

KINKAWA, K. et al. Up-regulation of the expressions of phospholipase A2 inhibitors in the liver of a venomous snake by its own venom phospholipase A2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.395, p.377-381, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.

LANDUCCI, E. C. T. et al. Crotoxin induces aggregation of human washed platelets. **Toxicon**, v. 32, n. 2, p. 214–226, 1994.

LIZANO, S. et al. Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A2 myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. **The**

Biochemical journal, v. 326 Pt 3, p. 853–859, 1997.

LIZANO, S. et al. Two phospholipase A 2 inhibitors from the plasma of *Cerrophidion (Bothrops) godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A 2 myotoxins from its own venom : isolation, molecular cloning and biological properties. **Biochem. J**, 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, n. 8, p. 963–977, 2003.

LUCAS, E. **Estudo interlaboratorial para o estabelecimento do veneno botrópico e do soro antibotrópico de referência nacional**. [s.l.] Fundação Oswaldo Cruz, 2009.

MARANGONI, F. A. et al. Unmasking snake venom of *Bothrops leucurus*: purification and pharmacological and structural characterization of new PLA2 Bleu TX-III. **BioMed research international**, v. 2013, jan. 2013.

MARKLAND, F. S. Review paper snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**. v. 36, n. 12, 1998.

MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: **Animais Peçonhentos no Brasil**. 2º ed ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 540.

NAHAS, L. et al. The inactivating effect of *Bothrops jararaca* and Waglerophis merremii snake plasma on the coagulant activity of various snake venoms. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 21, n. 2, p. 239–246, jan. 1983.

NOGUCHI, H. Natural immunity of certain animals from snake venom. In: **Snake Venom**. [s.l.] ed. Washington D. C.: Carnegie Institute, 1909. v. 1909 p. 268.

OHKURA, N. et al. Isolation from the and Blood Amino Plasma Acid Sequence of a Phospholipase blomhoffii A2 Inhibitor siniticus ϵ^{TM} of Agkistrodon. v. 419, n. 1993, p. 413–419, 1993.

OHKURA, N. et al. The two subunits of a phospholipase A2 inhibitor from the plasma of thailand cobra having structural similarity to urokinase-type plasminogen activator receptor and LY-6 related proteins. **Biochemical and Biophysical research communications**, v. 204, n. 3, p. 1212–1218, 1994a.

OHKURA, N. et al. Isolation and characterization of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of the Thailand cobra Naja naja kaouthia. **Biochemical and biophysical research communications**, 1994b.

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.527-531

OHNO, M. et al. Molecular evolution of snake toxins: is the functional diversity of snake toxins associated with a mechanism of accelerated evolution? **Progress in nucleic acid research and molecular biology**, v. 59, p. 307–364, 1998.

OKUMURA, K. et al. A novel phospholipase A2 inhibitor with leucine-rich repeats from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 31, p. 19469–19475, 1998.

OKUMURA, K. et al. Mapping the region of the alfa-type phospholipase A2 inhibitor responsible for its inhibitory activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 45, p. 37651–37659, 2005.

OLIVEIRA, C. Z. et al. An alfa-type phospholipase A2 inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: Structural and functional characterization. **Biochimie**, v. 90, n. 10, p. 1506–1514, 2008.

OLIVEIRA, C. Z. **Caracterização funcional e estrutural de inibidores de fosfolipases A2 isolados do plasma de serpente Bothrops jararacussu**. Universidade de São Paulo p. 124, 2009.

OLIVEIRA, C. Z. et al. Structural and functional characterization of a γ -type phospholipase A2 inhibitor from bothrops jararacussu snake plasma. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 20, p. 2509–2519, 2011.

OMORI-SATOH, T.; YAMAKAWA, Y.; MEBS, D. The antihemorrhagic factor, erinacin, from the *European hedgehog* (*Erinaceus europaeus*), a metalloprotease inhibitor of large molecular size possessing ficolin/opsonin P35 lectin domains. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 38, n. 11, p. 1561–1580, nov. 2000.

OVADIA, M. Purification and characterization of an antihemorrhagic factor from the serum of the snake *Vipera palaestinae*. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 16, n. 6, p. 661–672, jan. 1978.

OVADIA, M.; KOCHVA, E.; MOAV, B. The neutralization mechanism of *Vipera palaestinae* neurotoxin by a purified factor from homologous serum. **Biochimica et biophysica acta**, v. 491, n. 2, p. 370–386, abr. 1977.

PERALES, J. et al. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 227, n. 1–2, p. 19–26, jan. 1995.

PÉREZ, J. C.; SÁNCHEZ, E. E. Natural protease inhibitors to hemorrhagins in snake venoms and their potential use in medicine. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 37, n. 5, p. 703–728, maio 1999.

PLA, D. et al. Proteomic an alysis of venom variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus *Bothriechis*). v. 152, p. 1–12, 2016.

PONRAJ, D.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Inhibitory effects of snake sera on several venom induced myonecrosis, haemorrhage and oedema activity in mice. **1st Asia-Pacific Anatomical Conference. ed. Singapore. 1996**

QI, Z. Q.; YONAHARA, K.; TOMIHARA, Y.; TOYAMA, S. Characterization of the antihemorrhagic factors of mongoose (*Herpestes edwardsii*). **Toxicon**, v. 32, p. 1459–1469, 1994.

QUIRÓS, S. et al. 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). **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 146, n. 1, p. 60–68, 2007.

RICHARDS, D. P.; BARLOW, A.; WÜSTER, W. Toxicon Venom lethality and diet : Differential responses of natural prey and model organisms to the venom of the saw-scaled vipers (*Echis*). **Toxicon**, v. 59, n. 1, p. 110–116, 2012.

SANTOS-FILHO, N. A. **Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A2 ácida toxica isolada da peçonha de Bothrops moojeni**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.

SANTOS-FILHO, N. A. **Caracterização funcional e estrutural de um Inibidor de fosfolipase A 2 tipo- α da serpente Bothrops alternatus : Clonagem , expressão e mapeamento da região responsável pela atividade inibitória**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.

SERRANO, S. M. T. et al. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 501–510, fev. 2005.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 8, p. 1115–1132, jun. 2005.

SHIMADA, A. et al. Subunit structure and inhibition specificity of alpha-type phospholipase A2 inhibitor from *Protobothrops flavoviridis*. **Toxicon**, v. 51, n. 5, p. 787–796, 2008.

SOARES, A. M. et al. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A2 myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 302, n. 2, p. 193–200, 2003.

SUNTRAVAT, M.; NUCHPRAYOON, I.; PÉREZ, J. C. Comparative study of anticoagulant and procoagulant properties of 28 snake venoms from families Elapidae, Viperidae, and purified Russell's viper venom-factor X activator (RVV-X). **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 56, n. 4, p. 544–553, jun. 2010.

TANAKA-AZEVEDO, A. M.; TANAKA, A. S.; SANO-MARTINS, I. S. A new blood coagulation inhibitor from the snake *Bothrops jararaca* plasma: isolation and

characterization. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 308, n. 4, p. 706–712, set. 2003.

TANAKA, A. M. **Isolamento e caracterização de um inibidor da atividade coagulante da trombina do sangue da serpente Bothrops jararaca (Wied, 1824) (Ophidae: Viperidae, Crotalinae)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2002.

TANIZAKI, M. M. et al. Purification of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 29, n. 6, p. 673–681, jan. 1991.

TEIXEIRA, C. F. P. et al. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. p. 107–115, 2005.

THWIN, M. M. et al. Recombinant antitoxic and antiinflammatory factor from the nonvenomous snake *Python reticulatus*: Phospholipase A2 inhibition and venom neutralizing potential. **Biochemistry**, v. 39, n. 31, p. 9604–9611, 2000.

THWIN, M. M.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: a mini review of the recent developments (1991-1997). **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 36, n. 11, p. 1471–82, nov. 1998.

TOMIHARA, Y.; YONAHARA, K.; NOZAKI, M.; YAMAKAWA, M.; KAWAMURA, Y.; KAMURA, T.; TOYAMA, S. Purification of an antihemorrhagic factor from the serum of the non-venomous snake *Dinodon semicarinatus*. **Toxicon**, v. 26, p. 420–423, 1988.

VALENTE, R. H. et al. BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor. Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 268, n. 10, p. 3042–52, maio 2001.

VAN DEENEN, L. L. M.; DE HAAS, G. H. The substrate specificity of phospholipase A. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Lipids and Related Subjects**, v. 70, n. 4, p. 538–553, 1963.

VIEIRA, C. O. et al. *Bothrops jararaca* fibrinogen and its resistance to hydrolysis evoked by snake venoms. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 151, n. 4, p. 428–32, dez. 2008.

VILCA-QUISPE, A. et al. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 55, n. 4, p. 745–53, abr. 2010.

VITAL-BRAZIL, O. Neurotoxin from the South american rattlesnake. **Formosan Med. Assoc.**, v. 71, p. 394–400, 1972.

WARRELL, D. A. Snake venoms in science and clinical medicine. 1. Russell's viper:

biology, venom and treatment of bites. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 6, p. 732–40, 1989.

WEINSTEIN, S. A.; LAFAYE, P. J.; SMITH, L. A. Observaton on a venom neutralizing albumin fraction isolated from the serum of the northern copperhead *Agkistrodon contortrix mokasen*. **Toxicon**, v. 28, p. 629, 1990.

WEISSENBERG, S. et al. Antihemorrhagic factors from the blood serum of the western diamondback rattlesnake *Crotalus atrox*. **Toxicon**, v. 29, n. 7, p. 807–818, jan. 1991.

WEISSENBERG, S.; OVADIA, M.; KOCHVA, E. Inhibition of the proteolytic activity of hemorrhagin-e from *Crotalus atrox* venom by antihemorrhagins from homologous serum. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 30, n. 5–6, p. 591–7, 1992.

YU, B.; BERG, O. G.; JAIN, M. K. The Divalent Cation Is Obligatory for the Binding of Ligands to the Catalytic Site of Secreted Phospholipase A2. **Biochemistry**, v. 32, p. 6485–6492, 1993.

Z. OLIVEIRA, C. et al. Structural and Functional Characterization of a γ -Type Phospholipase A2 Inhibitor from *Bothrops jararacussu* Snake Plasma. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 20, p. 2509–2519, out. 2011.

ZELANIS, A. et al. A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 3, p. e1554, jan. 2012.